



Institut für Biologische Informationsverarbeitung

***Arrestin – heterologe Expression,  
Mutagenese und  
biophysikalische Untersuchungen***

*Bianca Krafft*







***Arrestin – heterologe Expression,  
Mutagenese und  
biophysikalische Untersuchungen***

*Bianca Krafft*

**Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3675**  
ISSN 0944-2952  
Institut für Biologische Informationsverarbeitung Jül-3675  
D 61 (Diss. Universität Düsseldorf, 1999)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek  
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland  
☎ 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: [zb-publikation@fz-juelich.de](mailto:zb-publikation@fz-juelich.de)

Vision is a precious gift that deeply enriches our live, for it allowes  
us to see the order and beauty of this world.

r.w. rodieck, 1998





## Arrestin – heterologe Expression, Mutagenese sowie biophysikalische Untersuchungen

Arrestin ist eine entscheidende Komponente in der Abschaltung und Regulation der lichtinduzierten Signalkaskade. Nach Phosphorylierung des lichtaktivierten Rhodopsins durch die Rhodopsinkinase (P-R\*) kann Arrestin binden und eine Interaktion von P-R\* mit dem G-Protein Transducin verhindern. In dieser Arbeit wurde ein heterologes Expressionssystem in *S. cerevisiae* für Arrestin aus Stäbchen des Rinderauges entwickelt. Rekombinantes Arrestin stimmt in seinen biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften mit dem Protein aus Retinae überein. Im SDS-Gel läuft retinales Arrestin als Doppelbande bei etwa 54 kDa, wobei N- oder C- terminale Modifikationen der rekombinanten Proteine (MRGS-6His, 6His, StrepTagII, GST) eine Verschiebung zu höheren Molekulargewichten bewirken. Nach Isoelektrischer Fokussierung zeigen die rekombinanten Arrestine größere Homogenität als das retinale Protein. Massenspektrometrische Untersuchungen und N-terminale Proteinsequenzierung (Edmann-Abbau) ergaben, daß entsprechend dem retinalen Protein 3 bis 4 Aminosäuren des Aminoendes fehlen können. Bindungsstudien mit *in vitro* phosphoryliertem Rhodopsin (PMBs) beweisen lichtabhängige Bindung der rekombinanten Arrestine an P-R\*. Die verschiedenen N- oder C-terminalen Modifikationen scheinen keinen Einfluß auf Bindung bzw. Spezifität zu nehmen. Die Fusionsproteine Arrestin-GST und GST-Arrestin binden ebenfalls an P-R\*. Dies deutet darauf hin, daß die postulierte Konformationsänderung von einer inaktiven in eine bindende Form von Arrestin nur durch kleine Bewegung des N- oder C-Terminus erfolgen kann. Zur Lokalisierung der Interaktionsbereiche zwischen Arrestin und Rhodopsin mittels sterischer Hinderung, wurden in putative Bindungsdomänen Cysteine eingeführt, welche zur Kopplung großer Moleküle (Biotin, Fluorescein) dienen sollen. Es konnte bisher die Mutante Arrestin-V244C-6His isoliert und untersucht werden. Sie entspricht in ihrem Bindungsverhalten an PMBs dem nativen Arrestin. Die Röntgenstrukturanalyse des rekombinanten Arrestin-6His zeigt im Vergleich zum retinalen Arrestin Identität in Bezug auf Raumgruppe und Gitterkonstanten. Rekombinantes und retinales Arrestin haben eine analoge Packung im Kristall und es werden die gleichen Differenzen zwischen den Molekülen A und B der asymmetrischen Einheit festgestellt. Mit großer Sicherheit kann ausgeschlossen werden, daß verschiedene Bindungsformen (aktiv, inaktiv) von Arrestin im Kristall vorliegen. Der C-Terminus von Arrestin-6His zeigt, identisch zum retinalen Arrestin, eine hohe Flexibilität und ist in der Elektronendichtekarte nicht sichtbar.

## Arrestin – heterologous expression, mutagenesis and biophysical studies

Arrestin is a critical component in the deactivation and regulation of the light-induced signal cascade. After phosphorylation of the light activated rhodopsin by a rhodopsin kinase (P-R\*), arrestin is able to bind and thereby to inhibit the interaction of rhodopsin with its G-protein transducin. In this study a heterologous expression system for arrestin from bovine rod outer segments in *S. cerevisiae* was developed. The recombinant arrestin is identical with the retinal protein in terms of biochemical and biophysical characteristics. Retinal arrestin runs at 54 kDa as a double band on a SDS-gel, the N- or C- terminal modifications (MRGS-6his, 6his, StrepTagII, GST) cause a slight shift to a higher molecular weight. After isoelectric focussing the recombinant arrestins show higher homology compared to the retinal protein. Mass spectroscopy and N-terminal sequencing (edmann-degradation) indicated that with respect to the retinal protein 3 to 4 aminoacids of the aminoterminalus can be missing. Binding studies to *in vitro* phosphorylated rhodopsin (PMBs) result in light-dependend binding of the recombinant arrestins to P-R\*. It seems that the different N- or C-terminal modifications have no influence on binding or specificity. The arrestin-GST and GST-arrestin fusion proteins also bind to P-R\*, this gives evidence that the putative conformational change of arrestin from an inactive to an active form, can result only from slight movements of the N- or C-terminus. To localize the interaction region between arrestin and rhodopsin by steric hindrance, cysteins which will be used for the coupling of large molecules (biotin, fluorescein) were intruduced in putative binding domains. So far, the arrestin-V244C-6his mutant has been isolated and examined and its binding performance to PMBs is similar to the native arrestin. Compared to the retinal arrestin, the x-ray structural analysis of recombinant arrestin-6his shows identity in terms of space group and lattice constants. Recombinant and retinal arrestin both have analogous packing in the crystal and the same differences between molecules A and B in the asymmetric unit. Its about safe to say that no different binding conformations (active, inactive) of arrestin are present in the crystal. Similar to the retinal arrestin, the C-terminus of arrestin-6his shows a high flexibility and is not visible in the electron density map.



<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Aufbau der Stäbchenzelle des Rinderauges .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Struktur und Funktion von Rhodopsin .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. Die Sehkaskade.....</b>	<b>3</b>
<b>1.4. Arrestin .....</b>	<b>6</b>
1.4.1. Entdeckung und Eigenschaften von Arrestin .....	6
1.4.2. Bindungsverhalten von Arrestin an Rhodopsin.....	6
1.4.3. Vorkommen und subzelluläre Verteilung von Arrestinen.....	8
1.4.4. Arrestin unter medizinischen Gesichtspunkten .....	9
<b>1.5. Die Röntgenkristallstruktur von Arrestin bei 3.3 Å .....</b>	<b>9</b>
<b>1.6. Zielsetzungen der Arbeit .....</b>	<b>13</b>
 <b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	 <b>14</b>
<b>2.1. Geräte und Zubehör .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2. Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3. Puffer, Lösungen und Medien .....</b>	<b>19</b>
2.3.1. Puffer und Lösungen .....	19
2.3.2. Medien.....	22
2.3.3. Dokumentation der Ergebnisse.....	23
<b>2.4. Organismen und Wachstumsbedingungen.....</b>	<b>23</b>
2.4.1. Kulturbedingungen für <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i> .....	23
2.4.2. Bestimmung der Zelldichte von bakteriellen bzw. Hefe-Flüssigkulturen.....	23
2.4.3. Organismen.....	24
2.4.4. Stammhaltung.....	25
<b>2.5. Überexpression von Proteinen in <i>E. coli</i>: Kulturbedingungen, Zellaufschluß     und Herstellung von klaren Zellysaten .....</b>	<b>25</b>
2.5.1. Herstellen von Proteinextrakten aus <i>E. coli</i> für analytische Zwecke .....	26
2.5.2. Selektiver Aufschluß des Periplasmatischen Raums von <i>E. coli</i> .....	26
<b>2.6. Überexpression von Proteinen in <i>S. cerevisiae</i>: Kulturbedingungen,     Zellaufschluß und Herstellung von klaren Zellysaten .....</b>	<b>27</b>
2.6.1. Zellaufschluß von <i>S. cerevisiae</i> mit Glasperlen nach Sphäroplastierung.....	28
2.6.2. Herstellen von TCA-Gesamtzellextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> für analytische Zwecke .....	28
<b>2.7. Arbeiten mit DNA .....</b>	<b>29</b>
2.7.1. Standardmethoden .....	29
2.7.2. Plasmide .....	29
2.7.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	30
2.7.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	30
2.7.4.1. Reaktionsbedingungen .....	30

2.7.4.2.	Reinigung von PCR- amplifizierten DNA-Fragmenten.....	31
2.7.4.3.	Klonierung von PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten .....	31
2.7.5.	DNA-Sequenzierung (Cycle Sequencing).....	31
2.7.5.1.	Kleine DNA-Fragmente, GATC-System .....	32
2.7.5.2.	Große DNA-Fragmente, LI-COR-System .....	32
2.7.6.	Oligonukleotide (Primer).....	33
2.7.6.1.	PCR-Primer .....	33
2.7.6.2.	Sequenzierungsprimer .....	34
2.7.6.3.	Mutageneseprimer .....	35
2.7.7.	Mutagenese des Arrestingens .....	35
2.7.8.	Agarosegelelektrophorese .....	36
2.7.9.	Konzentrieren von DNA mit Pellet Paint.....	36
2.7.10.	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA .....	36
2.7.11.	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit Plasmid-DNA.....	37
<b>2.8.</b>	<b>Arbeiten mit Proteinen .....</b>	<b>37</b>
2.8.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	37
2.8.2.	Färben von Proteinbanden in SDS-Polyacrylamid-Gelen.....	38
2.8.2.1.	Silberfärbung mit Roti-Black .....	38
2.8.2.2.	Färben mit Coomassie-Färbelösung.....	38
2.8.2.3.	Coomassie-Färbung mit GelCode .....	38
2.8.2.4.	Färben mit Sypro-Orange.....	39
2.8.3.	Westernblotanalyse.....	39
2.8.3.1.	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran.....	39
2.8.3.2.	Immunochemische Detektion.....	40
2.8.3.3.	“Strippen“ von Westernblots.....	40
2.8.3.4.	Verwendete Antikörper und Konjugate .....	41
2.8.4.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	42
2.8.4.1.	Methode nach Bradford.....	42
2.8.4.2.	UV-VIS Spektroskopie.....	42
2.8.5.	Umpuffern und Konzentrieren von Proteinen .....	43
<b>2.9.</b>	<b>Affinitätschromatographie.....</b>	<b>43</b>
2.9.1.	Spaltung von GST-Fusionsproteinen durch die Protease Thrombin.....	46
2.9.2.	Anionenaustausch-Chromatographie mittels FPLC .....	46
<b>2.10.</b>	<b>Präparation von Proteinen aus Rinderaugen.....</b>	<b>46</b>
2.10.1.	Präparation von Stäbchenaußensegmenten (ROS).....	46
2.10.2.	Herstellung gewaschener, nativer ROS-Membranen (W-ROS).....	47
2.10.3.	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von nativen ROS-Membranen (PMBs).....	48
2.10.4.	Herstellung von Retinaextrakt.....	49
2.10.5.	Reinigung von Arrestin .....	49

<b>2.11.</b>	<b>Isoelektrische Fokussierung .....</b>	<b>50</b>
<b>2.12.</b>	<b>Massenspektrometrische Untersuchungen .....</b>	<b>50</b>
2.12.1.	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI-TOF-MS) .....	50
2.12.2.	Elektro Spray Ionisierung (ESI-MS) .....	51
<b>2.13.</b>	<b>Edmann Abbau, N-terminale Proteinsequenzierung .....</b>	<b>51</b>
<b>2.14.</b>	<b>Zentrifugations-Bindungs-Assay .....</b>	<b>51</b>
<b>2.15.</b>	<b>Kristallisationsmethoden.....</b>	<b>52</b>
2.15.1.	Kristallisation von wildtypischem Arrestin.....	52
2.15.1.1.	Ermittlung der optimalen Tropfen-Zusammensetzung .....	53
2.15.1.2.	Kristallisationsansätze .....	53
2.15.2.	Kristallisation von rekombinantem Arrestin .....	54
2.15.3.	Auflösen von Kristallen für analytische Zwecke .....	54
<b>2.16.</b>	<b>Kristallographische Methoden.....</b>	<b>55</b>
2.16.1.	Messung von Röntgen-Beugungsdaten unter Kryo-Bedingungen .....	55
2.16.2.	Präparation von Kristallen für die Kryokristallographie .....	55
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>56</b>
<b>3.1.</b>	<b>Überexpression von Arrestin in <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>56</b>
3.1.1.	Expression von Arrestin als N-terminale Glutathion-S-Transferase Fusion im Vektor pGEX-4T-1 .....	57
3.1.1.1.	Klonierung von Arrestin in den Vektor pGEX-4T-1 .....	58
3.1.1.2.	Expressionsbedingungen für Arrestin im Vektor pGEX-4T-1.....	58
3.1.1.3.	Zellaufschluß und Reinigung des Fusionsproteins GST-Arrestin aus der löslichen Fraktion, sowie anschließende Isolation von Arrestin .....	59
3.1.2.	Expression von Arrestin mit N-terminaler MRGS-6His Fusion im Vektor pQE-30 .....	63
3.1.2.1.	Klonierung von Arrestin in den Vektor pQE-30 .....	64
3.1.2.2.	Expression und Reinigung von MRGS-6His-Arrestin im Vektor pQE-30.....	64
3.1.3.	Expression von Arrestin mit C-terminaler StrepTagI Fusion im Vektor pASK7565	
3.1.3.1.	Klonierung von Arrestin-StrepTagI in den Vektor pASK75 .....	66
3.1.3.2.	Klonierung von ssOmpA-Arrestin-StrepTagI für Sekretion ins Periplasma....	67
3.1.3.3.	Expression und Reinigung von Arrestin-StrepTagI .....	67
3.1.4.	Zentrifugations-Bindungs-Assay zum Nachweis der Funktionalität von in <i>E. coli</i> exprimierten Arrestinen.....	69
<b>3.2.</b>	<b>Überexpression von Arrestin in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>71</b>
3.2.1.	Allgemeine Beschreibung des Vektors pEG-KT .....	72
3.2.1.1.	Klonierung von Arrestin in den Vektor pEG-KT.....	73
3.2.2.	Allgemeine Beschreibung des Vektors pYEX-BX .....	73
3.2.2.1.	Konstruktion von MRGS-6His-Arrestin im Vektor pYEX-BX.....	74

3.2.2.2.	Konstruktion von Arrestin-6His im Vektor pYEX-BX .....	74
3.2.2.3.	Konstruktion von Arrestin-StrepTagII im Vektor pYEX-BX.....	74
3.2.2.4.	Konstruktion von Arrestin-GST im Vektor pYEX-BX .....	75
3.2.3.	Auswahl des <i>S. cerevisiae</i> Expressionsstammes sowie der Expressionsbedingungen .....	76
3.2.3.1.	Wachstumsverhalten verschiedener <i>S. cerevisiae</i> Stämme in Abhängigkeit von Medium und Kohlenstoffquelle .....	77
3.2.3.2.	Vergleich der Arrestin-Expressionsraten in Vollmedium sowie unter Selektionsdruck in Minimalmedium.....	80
3.2.3.3.	Ermittlung der Kupfertoleranz des <i>S. cerevisiae</i> Stammes F11 .....	81
3.2.3.4.	Die optimierten Expressionsbedingungen.....	82
<b>3.3.</b>	<b>Reinigung der verschiedenen, in <i>S. cerevisiae</i> exprimierten Arrestin-Fusionsproteine.....</b>	<b>83</b>
3.3.1.	Zellaufschluß von <i>S. cerevisiae</i> : Einfluß verschiedener Methoden auf die Ausbeute an löslichem Protein .....	83
3.3.2.	Reinigung von Arrestin mit Modifikationen am N-Terminus nach Expression in <i>S. cerevisiae</i> .....	84
3.3.2.1.	Reinigung von GST-Arrestin mittels GST-Glutathion- Affinitätschromatographie .....	84
3.3.2.2.	Reinigung von MRGS-6His-Arrestin mittels IMAC .....	86
3.3.3.	Arrestin mit Modifikationen am C-Terminus.....	87
3.3.3.1.	Reinigung von Arrestin-6His mittels IMAC .....	87
3.3.3.2.	Reinigung von Arrestin-StrepTagII über StrepTaktin-Sepharose.....	88
3.3.3.3.	Reinigung von Arrestin-GST mittels GST-Glutathion- Affinitätschromatographie .....	90
3.3.4.	Ausbeuten der verschiedenen Reinigungsverfahren .....	91
<b>3.4.</b>	<b>Arrestin Mutagenese.....</b>	<b>92</b>
3.4.1.	Austausch der wildtypischen Cysteine von Arrestin gegen Serine .....	92
3.4.2.	Austausch von Aminosäuren in den Kuppeln von Arrestin: Zielgerichtete Mutagenese von Ser 60, Ser 169, Val 244 und Pro 352.....	93
3.4.3.	Expression und Reinigung von Arrestin Mutanten .....	94
3.4.4.	Expression der Spleißvariante von Arrestin p44 in <i>S. cerevisiae</i> .....	95
3.4.4.1.	Klonierung von p44-Konstrukten in den Vektor pYEX-BX.....	95
3.4.4.2.	Expression und Reinigung von p44 aus <i>S. cerevisiae</i> .....	96
<b>3.5.</b>	<b>Zentrifugations-Bindungs-Assays zum Nachweis der Funktionalität von in <i>S. cerevisiae</i> exprimierten Arrestinen.....</b>	<b>97</b>
I.	Untersuchung der GST-Arrestin Fusion sowie aus GST-Arrestin isoliertes Arrestin im Vergleich zum Arrestin aus dem Rinderauge .....	98

II.	Bindungs-Assay von MRGS-6His-Arrestin sowie Arrestin-6His im Vergleich zum Arrestin aus dem Rinderauge .....	99
III.	Untersuchung der verschiedenen N- und C-terminal modifizierten rekombinanten Arrestine im Vergleich zum Arrestin aus dem Rinderauge .....	102
<b>3.6.</b>	<b>Kristallisation von Arrestinen.....</b>	<b>106</b>
3.6.1.	Kristallisation von retinalem Arrestin aus dem Rinderauge.....	106
3.6.2.	Kristallisation von modifiziertem, wildtypischem Arrestin aus <i>S. cerevisiae</i> .....	109
3.6.3.	Auflösen von Kristallen für analytische Zwecke .....	110
<b>3.7.</b>	<b>Proteinanalyse von Arrestinen mit biochemischen und spektroskopischen Methoden .....</b>	<b>111</b>
3.7.1.	Überprüfung der Homogenität von Arrestinen mittels Isoelektrischer Fokussierung .....	111
3.7.2.	Ermittlung der Masse von Arrestin-StrepTagII mittels Elektro Spray Ionisierung (ESI) .....	112
3.7.3.	N-terminale Sequenzierung (Edmann-Abbau) von retinalem Arrestin und Arrestin-6His .....	113
3.7.4.	Bestimmung der Masse von retinalem Arrestin sowie Arrestin-6His mittels Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI) .....	113
<b>3.8.</b>	<b>Röntgenstrukturanalyse von Kristallen aus rekombinantem Arrestin .....</b>	<b>115</b>
3.8.1.	Untersuchungen an nativen Kristallen.....	115
3.8.2.	Untersuchungen an Schweratomderivaten .....	116
3.8.3.	Untersuchungen des "PIP"-Arrestin-6His Derivats .....	118
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>120</b>
<b>4.1.</b>	<b>Expression von Arrestin in <i>E. coli</i> .....</b>	<b>120</b>
<b>4.2.</b>	<b>Expression von Arrestin in <i>S. cerevisiae</i> .....</b>	<b>122</b>
4.2.1.	Optimierung der Expressions- und Zellaufschlußbedingungen .....	122
4.2.2.	Reinigung der rekombinanten wildtypischen Arrestine sowie p44 aus <i>S. cerevisiae</i> ; Betrachtung von Ausbeute und biochemischen Eigenschaften der Proteine.....	123
4.2.3.	Indikation und Relevanz der Expression von wildtypischem Arrestin mit verschiedenen N- und C-terminalen Modifikationen .....	129
4.2.4.	Arrestin-Mutanten auf der Basis der dreidimensionalen Raumstruktur und dem aktuellen Bindungsmodell .....	130
4.2.5.	Untersuchung der Bindungseigenschaften der rekombinanten Arrestine im Zentrifugations-Bindungs-Assay sowie Interpretation der Resultate .....	134
4.2.5.	Eine Anwendungsmöglichkeit des Hefe-Expressionssystems: Anhaltspunkte zur Entwicklung eines <i>in vivo</i> Testsystems .....	136

4.2.6.	Kristallisation der rekombinanten Arrestine, Untersuchung mit kristallographischen Methoden und Interpretation der Daten .....	137
5.	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>139</b>
6.	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>140</b>
7.	<b>ANHANG.....</b>	<b>157</b>
7.1.	<b>Kodierende DNA- und Aminosäuresequenz von Arrestin aus dem Rinderauge.....</b>	<b>157</b>
7.2.	<b>Plasmide und Vektoren .....</b>	<b>158</b>
7.2.1.	Klonierungsvektoren .....	158
7.2.2.	<i>E. coli</i> Expressionsvektoren .....	160
7.2.3.	<i>E. coli</i> – <i>S. cerevisiae</i> Shuttle Vektoren .....	161
7.3.	<b>Klonierungsschema für Arrestin-GST im Vektor pYEX-BX.....</b>	<b>162</b>
7.4.	<b>ESI-Spektrum von Arrestin-StrepTagII.....</b>	<b>163</b>
7.5.	<b>MALDI-Spektren .....</b>	<b>163</b>
7.6.	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>165</b>



# 1. Einleitung

Signalverarbeitende Systeme befähigen Organismen, sich mit den verschiedenen reizerzeugenden Vorgängen in Ihrer Umwelt erfolgreich auseinanderzusetzen. Der dabei erfolgende Informationsfluß ist oft sehr komplex. Im Auge beinhaltet er die Transformation eines Lichtreizes über ein biochemisches Signal in einen veränderten elektrophysiologischen Zustand. Diese Phototransduktion ist das am besten untersuchte Beispiel von G-Protein gekoppelter Signaltransduktion. G-Protein gekoppelte Rezeptoren gehören zur Klasse der integralen, 7-helikalen Membran Rezeptoren und funktionieren als Sensoren für externe Signale in Form von Liganden oder Photonen. Eine der drei Subfamilien ist die Klasse der Rhodopsin ähnlichen Rezeptoren, zu denen neben den Opsinen auch z.B. die  $\alpha$ - und  $\beta$ - adrenergen Rezeptoren gehören.

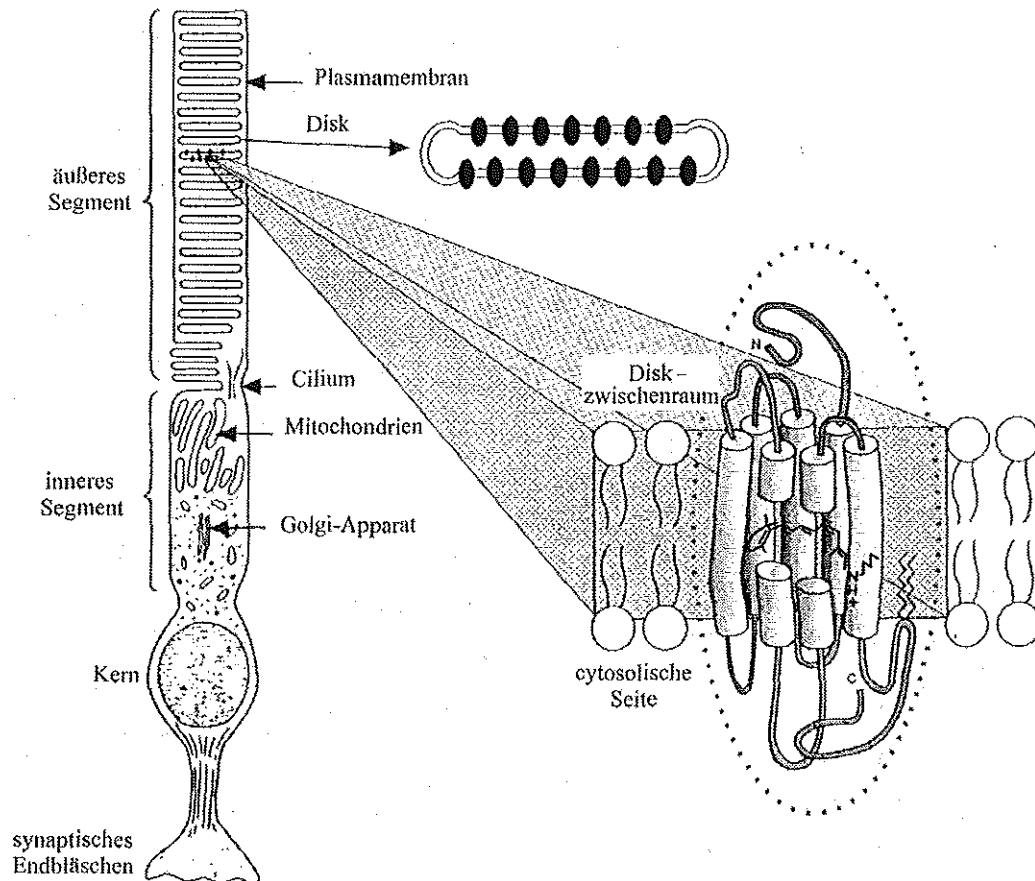
## 1.1. Aufbau der Stäbchenzelle des Rinderauges

Man kann in der Retina von Wirbeltieren zwei Typen von Photorezeptorzellen unterscheiden, Zapfen und Stäbchen. In den Zapfen sind drei verschiedene Sehpigmente verankert, die durch ihre unterschiedliche spektrale Empfindlichkeit die Farbwahrnehmung ermöglichen. Stäbchen arbeiten bei niedrigen Lichtintensitäten und sind für das Hell-Dunkel Sehen ausgelegt (Stryer, 1996). Ihre Sensitivität ermöglicht es sogar einzelne Photonen zu detektieren (Baylor et al., 1979; Nunn & Baylor, 1982; Rieke & Baylor, 1998). Die Stäbchen enthalten in den Außensegmenten den Photorezeptor Rhodopsin. Da Außensegmente von Stäbchen sich aus Rinderaugen einfach präparieren lassen, ist deren lichtaktivierte Signaltransduktion einer der am genauesten untersuchten biochemischen Signalwandlungsprozesse.

Die Stäbchenzelle des Rinderauges ist zylinderförmig und hat eine Länge von etwa 100  $\mu\text{m}$  sowie einen Durchmesser von etwa 1,2  $\mu\text{m}$ . Sie ist in ein Außen- und ein Innensegment unterteilt, welche durch einen schmalen Steg, genannt Cilium, miteinander verbunden sind (Abb. 1.1). Das Innensegment ist für den Zellstoffwechsel und für die Generierung und Weiterleitung des Membranpotentials verantwortlich.

Das Außensegment der Stäbchenzelle besteht aus einer Plasmamembran, die 500 bis 1000 flach übereinander geschichtete Vesikel, die sogenannten Disks umschließt. Die Disks werden im proximalen Teil des Außensegmentes ständig durch Ausstülpung der Membran des Ciliums neu gebildet und wandern in den oberen Teil des Stäbchens, wo sie durch Pigmentepithelzellen wieder abgebaut werden (Kinney et al., 1978; Steinberg et al., 1980).

Der überwiegende Anteil der in der Membran eingebetteten Proteine sind Rhodopsinmoleküle (Daemen, 1973).



**Abbildung 1.1.:** Darstellung einer Stäbchenzelle, der Diskmembran mit Rhodopsinmolekülen sowie in der Ausschnittsvergrößerung das Rhodopsinmolekül in der Diskmembran. Das  $\alpha$ -Helix-Bündel-Modell von Rhodopsin ist in Zylinderform schematisch gezeigt. Die Bindungstasche für das 11-cis-Retinal ist schematisch angedeutet (nach Hargrave & Hamm, 1994).

## 1.2. Struktur und Funktion von Rhodopsin

Die Primärstruktur von Rinderrhodopsin wurde 1983 von Ovchinnikov (Ovchinnikov et al., 1983) und Hargrave (Hargrave et al., 1983) aufgeklärt. Rinderrhodopsin ist aus einem Apoprotein, dem Opsin, sowie aus einem kovalent an das Opsin gebundenen Chromophor, dem 11-cis-Retinal aufgebaut. Das Opsin ist ein Glycoprotein, welches aus 348 Aminosäuren besteht, sein Molekulargewicht beträgt 40 kDa. Die Polypeptidkette bildet sieben transmembrane Helices, die durch Schleifen, den sogenannten Loops, miteinander verbunden sind. Der N-Terminus befindet sich im Diskzwischenraum. Die auf der cytoplasmatischen Seite der Diskmembran befindlichen Loops sind zusammen mit dem C-Terminus für die Interaktion mit den Proteinen der Sehkaskade verantwortlich (Abb. 1.1.).

Die Aminosäuren Cys 322 und Cys 323 des C-terminalen Endes sind palmitoyliert, was zu einer Verankerung der Polypeptidkette in der Membran auf ihrer cytoplasmatischen Seite und zur Bildung eines zusätzlichen Loops führt (Ovchinnikov et al., 1988). Im N-terminalen Bereich sind die Aminosäuren Asp 2 und Asp 15 glycosyliert (Fukuda et al., 1979).

Das 11-*cis*-Retinal befindet sich im hydrophoben Inneren des Opsins, und ist über eine protonierte Schiff'sche Base kovalent an die Aminosäure Lys 296 gebunden (Wald, 1968). Nach Absorption eines Lichtquants erfolgt die Isomerisierung vom gekrümmten 11-*cis*-Retinal zum gestreckten all-*trans*-Retinal. Dieser Prozeß bewirkt Konformationsänderungen des Opsin-Anteils, es werden sukzessive verschiedene Intermediate gebildet und umgesetzt, die sich im UV-VIS Spektrum voneinander unterscheiden (Wald & Brown, 1958; Wald, 1968; Yoshizawa & Shichida, 1982).

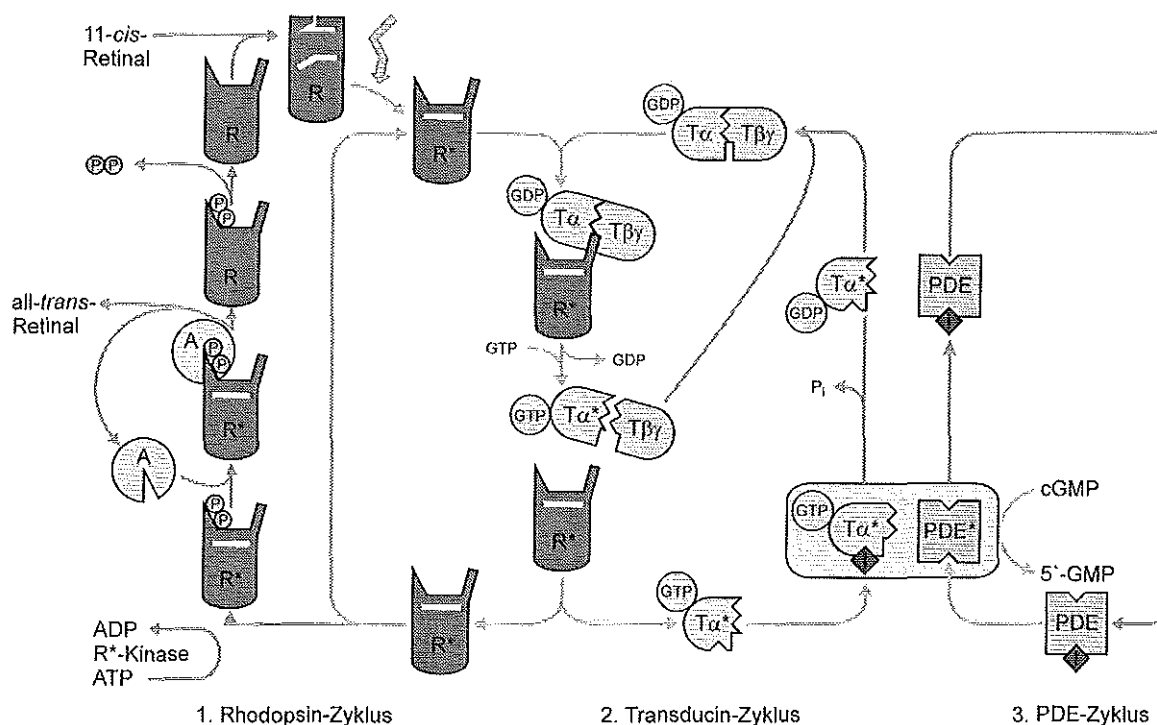
Innerhalb weniger Millisekunden nach Belichtung stellt sich ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen Metarhodopsin I und Metarhodopsin II ein, das sich *in vitro* sowohl durch Temperatur- und pH-Änderungen (Parkes & Liebmann, 1984), als auch durch die Zugabe von Transducin (Emeis & Hofmann, 1981) oder Arrestin (Schleicher et al., 1989) verschieben läßt.

Metarhodopsin II (R\*) ist die biochemisch aktive Konformation des Rhodopsins (Emeis et al., 1982; Bennett et al., 1982; Kibelbek et al., 1991). Die Rhodopsinkinase kann dabei an Metarhodopsin I und II binden, während Transducin nur in der Lage ist an Metarhodopsin II (R\*) anzukoppeln. Im Gegensatz zu Arrestin und Transducin ist die Rhodopsinkinase jedoch nicht in der Lage die Meta-II-Konformation von Rhodopsin zu stabilisieren (Pulvermüller et al., 1993; Arnis & Hofmann, 1993). Erwiesen ist jedoch, daß R\* durch Phosphorylierungen stabilisiert wird (Gibson et al., 1998). Die Lebensdauer von R\* beträgt etwa  $10^3$  s (Hofmann, 1986), danach zerfällt es in Opsin und all-*trans*-Retinal (Schleicher et al., 1989), oder wird in Metarhodopsin III umgewandelt.

### 1.3. Die Sehkaskade

An die aktive Form von Rhodopsin R\* bindet das G-Protein Transducin (Kühn, 1980; Fung & Stryer, 1980; Hargrave et al., 1993; Arnis & Hofmann, 1995; Jäger et al., 1996) wahrscheinlich an dessen C-D und E-F Loops sowie an das C-terminale Ende (König et al., 1989; Franke et al., 1992; Acharya et al., 1997). Transducin ist aus drei Untereinheiten zusammengesetzt, die als  $T_\alpha$ ,  $T_\beta$  und  $T_\gamma$  bezeichnet werden. Die  $T_\alpha$ -Untereinheit besitzt eine Nukleotidbindestelle (Kühn, 1980; Fung et al., 1981), welche GDP gebunden hat. Nach der Wechselwirkung des Transducins mit R\* verliert das Transducin seine Affinität zu GDP und bindet dafür GTP, was zur Dissoziation der  $T_\alpha$ -Untereinheit von der  $T_{\beta\gamma}$ -Untereinheit und der Diskmembran führt (Kühn, 1980;

Fung & Stryer, 1980). Da diese Vorgänge innerhalb einer Millisekunde erfolgen (Vuong et al., 1984; Kahlert & Hofmann, 1991; Bruckert et al., 1992), können bis zur Unterbrechung der Sehkaskade durch die Bindung der Rhodopsinkinase und des Arrestins, von einem lichtaktivierten Rhodopsinmolekül mehrere Hundert Transducinmoleküle aktiviert werden (Dawis et al., 1988; Felber et al., 1996). Die  $T_\alpha$ -Untereinheit aktiviert dann eine cGMP Phosphodiesterase (PDE) (Fung et al., 1981; Uchida et al., 1981). Dieses Enzym ist wie Transducin membranassoziiert. Es besteht aus vier Untereinheiten, jeweils eine katalytische  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheit sowie zwei inhibitorische  $\gamma$ -Untereinheiten (Baehr et al., 1979; Ovchinnikov et al., 1986, 1987; Deterre et al., 1988; Lipkin et al., 1990b). Die beiden  $\gamma$ -Untereinheiten unterdrücken die Hydrolyseaktivität der PDE (Hurley & Stryer, 1982), die Aktivierung erfolgt indem der Inhibitor  $PDE_\gamma$  durch  $T_\alpha$ -GTP gebunden und entfernt wird (Wensel & Stryer, 1986, 1990; Deterre et al., 1986; Skiba et al., 1996; Liu et al., 1996). Die Umsatzrate des Enzyms PDE hat eine Größenordnung von mehreren tausend hydrolysierten cGMP pro PDE-Molekül pro Sekunde.



**Abbildung 1.2.:** Schematische Darstellung der Reaktionszyklen von Rhodopsin (R), Transducin (T) und der Phosphodiesterase (PDE), weitere Abkürzungen sind im Text erläutert (entnommen aus: Müller & Kaupp, 1998).

cGMP ist der sekundäre Botenstoff zwischen Rhodopsin und den cGMP abhängigen Kationenkanälen der Cytoplasmamembran. Im Dunkelzustand liegt ein depolarisierter Zustand der Plasmamembran vor. Da der cGMP-Gehalt in den Stäbchen der Retina hoch ist kommt es zu einem  $Na^+$ -Einstrom, einem  $K^+$ -Ausstrom und zu einer Erhöhung des cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Gehalts. Belichtung führt zur Abnahme des cGMP-Gehalts in der Zelle unter Bildung von 5'-GMP. Dadurch kommt es zur Schließung der cGMP abhängigen

Kationenkanäle und somit zu einer Hyperpolarisation der Plasmamembran und einer Verminderung des cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts (Müller & Kaupp, 1998; Bielka & Börner, 1995). An den nachgeschalteten Ganglienzellen wird dadurch ein Aktionspotential generiert, das in das Zentralnervensystem weitergeleitet wird.

Um die Lichtreaktion zu limitieren, dürfen nur wenige PDE-Moleküle aktiviert werden. Dies ist nur möglich, wenn die cytoplasmatische Seite von  $\text{R}^*$  schnell und effektiv blockiert wird, bevor zu viele Transducine sequentiell dort interagieren können. Transducin inaktiviert sich selbst durch eine intrinsische GTPase Aktivität von  $\text{T}_\alpha$  (Fung, 1983; Dratz et al., 1987; Arshavsky et al., 1989). Die Notwendigkeit für eine schnelle Abschaltung der Enzymkaskade erklärt sich auch aus der Lebensdauer von  $\text{R}^*$ , die bei mehr als 15 min liegt (Hofmann & Heck, 1996). Eine Regulation der Signaltransduktion, in der sehr kurze Reize (z.B. Lichtblitze) in elektrische Potentiale umgewandelt werden müssen, ist alleine durch Deaktivierung (Zerfall in Opsin und Retinal) nicht möglich. Bei aufeinanderfolgenden Lichtblitzen in kurzen Intervallen muß der Rezeptor entsprechend schnell inaktiviert werden.

Die Abschaltung der Enzymkaskade beginnt mit der Bindung der Rhodopsinkinase an  $\text{R}^*$  und der darauffolgenden Phosphorylierung des C-terminalen Endes von Rhodopsin. Dabei können durch die Rhodopsinkinase *in vitro* bis zu neun Phosphatgruppen übertragen werden (Kühn & Dreyer, 1972; Bownds et al., 1972; McDowell & Kühn, 1977; Wilden & Kühn, 1982; Palczewski et al., 1991a). Von den verschiedenen potentiellen Phosphorylierungsstellen sind *in vivo* wahrscheinlich nur die Aminosäuren Ser 334, Ser 338, Ser 343 und eventuell Thr 340 kritisch für die Abschaltung von  $\text{R}^*$  (Ohguro et al., 1994; 1995; 1996; Zhao et al., 1995; Zhang et al., 1997), wobei die erste Phosphatgruppe auf das Ser 338 übertragen wird (Ohguro et al., 1993a; 1995). Bereits nach der Übertragung einer Phosphatgruppe auf das lichtaktivierte Rhodopsin erfolgt bereits die Bindung von Arrestin (Wilden, 1995). Die Phosphate reduzieren die Affinität zu Transducin und steigern die Bindung von Arrestin, die gebundene Rhodopsinkinase wurde zuvor inaktiviert (Wilden et al., 1986a; Palczewski et al., 1992a; Wilden, 1995; Dean & Akhtar, 1996). Mit der Bindung von Arrestin ist die Sehkaskade beendet, die Interaktion zwischen  $\text{R}^*$  und Transducin wird sterisch blockiert (Abb. 1.2.).

Rhodopsin wird wieder regeneriert, indem das im Abschaltzyklus phosphorylierte Opsin während der Abspaltung des Arrestins durch eine Proteinphosphatase dephosphoryliert wird (Fowles et al., 1989; Palczewski et al., 1989b; Hofmann et al., 1992). All-*trans*-Retinal wird nach einer Reduktion zu all-*trans*-Retinol durch die Retinaldehydrogenase enzymatisch zu 11-*cis*-Retinal umgewandelt, und ist somit für eine erneute Bindung an Opsin verfügbar. Dazu muß dieses *cis*-Konformer noch kovalent am Opsinmolekül verankert werden (Jones et al., 1989; Bernstein et al., 1987).

## **1.4. Arrestin**

### **1.4.1. Entdeckung und Eigenschaften von Arrestin**

1973 gelang es W. Wacker aus Retinaextrakt ein Antigen zu isolieren, welches bei Versuchstieren zu einer experimentellen allergischen Uveitis führt. Er bezeichnete dieses Protein als S-Antigen (Wacker, 1973). H. Kühn konnte 1984 nachweisen, daß ein von ihm entdecktes Protein in den Stäbchenzellen von Retinen aus Rinderaugen, welches er 48K nannte, an lichtaktivierte Membranen bindet (Kühn et al., 1984). Weitere Versuche ergaben, daß das 48K-Protein an lichtaktiviertes und phosphoryliertes Rhodopsin (P-R\*) bindet, und somit den photoaktivierten Rezeptor inaktiviert (Wilden et al., 1986a; Kühn & Wilden, 1987). Aufgrund der arretierenden Funktion des 48K-Proteins in der Sehkaskade wurde es als Arrestin bezeichnet (Zuckerman & Cheasty, 1986). Arrestin und S-Antigen sind identisch (Pfister et al., 1985).

Retinales Rinderarrestin aus Stäbchenaußensegmenten besteht aus 404 Aminosäuren (Shinohara et al., 1987) mit einem Molekulargewicht von 45317 Da. Es wurde diskutiert, daß Arrestin mit Kohlenhydraten modifiziert ist (Dorey et al., 1979; Borthwick & Forrester, 1983; Banga et al., 1987) sowie phosphoryliert wird (I. Weyand, Dissertation, 1988; Weyand & Kühn, 1990). Massenspektrometrische Untersuchungen ergaben jedoch, daß Arrestin post-translational nur durch eine Acetylierung am N-terminalen Ende modifiziert wird (Buczylko & Palczewski, 1993). Arrestin kann durch isoelektrische Fokussierung in mehrere Isoformen aufgetrennt werden. Diese haben einen pI-Wert zwischen 5,5 und 6,2. Als Ursache für die Mikroheterogenität können zum einen Differenzen in der Primärstruktur herangezogen werden, da Arrestin aus verschiedenen Individuen sich in jeweils unterschiedliche Subspezies auftrennen läßt (I. Weyand, Dissertation, 1988). Dies wird unterstützt durch die Tatsache, daß die Primärsequenz nach Protein- und DNA-Sequenzierung (Shinohara et al., 1987) von der nach Sequenzierung nur auf DNA-Ebene (Yamaki et al., 1987) in 4 Aminosäuren (Positionen 35 Val zu Leu; 119 Leu zu Val; 177 Val zu Ile; 317 Asp zu His) abweicht (Weyand & Kühn, 1990). Auch durch Proteolyse kann Heterogenität erzeugt werden. Sowohl der N-terminale Bereich als auch die Region um den C-Terminus ist proteolytisch besonders instabil (Palczewski et al., 1991c).

### **1.4.2. Bindungsverhalten von Arrestin an Rhodopsin**

Es konnte gezeigt werden, daß Arrestin nur an die Meta II Konformation des Rhodopsins (R\*) bindet (Schleicher et al., 1989). Wie bereits dargestellt, besitzt R\* eine Schlüsselstellung in der Enzymkaskade des Sehvorgangs. Voraussetzung für die Bindung von Arrestin an

Metarhodopsin II ist die vorhergehende Phosphorylierung des lichtaktivierten Rhodopsinmoleküls durch das Enzym Rhodopsinkinase (Kühn et al., 1973; Kühn, 1978).

Es wurde postuliert, daß zur Interaktion mit P-R\* Arrestin in einer bindenden Konformation vorliegen muß, d.h. zuvor eine Umwandlung einer inaktiven Form des Arrestins in eine andere, zur Bindung befähigten Konformation stattfindet. Beide Konformationen liegen im Gleichgewicht vor (Palczewski et al., 1991b). Man nimmt an, daß eine wesentliche Funktion der Aminosäuren im C-terminalen Bereich von Arrestin die Stabilisierung der inaktiven Konformation sein könnte (Palczewski et al., 1991c, 1994a; Gurevich & Benovic, 1993a)

Ein von Ohguro vorgeschlagenes, molekulares Modell zum Mechanismus der Konformationsänderung (Ohguro et al., 1994; Palczewski, 1994b), geht von einer intramolekularen Salzbrücke zwischen den C-terminalen Aminosäuren und einer polybasischen, Lysin-reichen, Region im Arrestin aus. Diese Salzbrücke wird durch Interaktion mit dem phosphorylierten C-Terminus des Rhodopsins aufgebrochen. Somit werden vorher blockierte Bindungsstellen für P-R\* am Arrestinmolekül freigelegt und es kann zusätzlich eine Bindung an diesen Sequenzbereichen des Arrestins erfolgen. Das Modell wird von den experimentellen Befunden unterstützt, daß das am C-terminalen Ende um 35 Aminosäuren verkürzte p44-Protein, die Spleißvariante von Arrestin (Smith et al., 1994), in der Lage ist, an unphosphoryliertes R\* zu binden (Palczewski et al., 1994a).

Es wurden *in vitro* verschiedene Mutanten sowie chimäre Arrestine erzeugt (Gurevich & Benovic 1992, 1993a, b; Gurevich et al., 1994, 1995, 1997), die zu dem aktuellen Bindungsmodell von Arrestin führten (Gurevich, 1998). Dabei wird jedem Bereich des Proteins eine spezielle Funktion während der Bindung an P-R\* zugeordnet. Folgende primäre Bindungsstellen werden diskutiert: Die N-terminale Hälfte (AS 29-163) wird zur Erkennung der Lichtaktivierung benötigt und interagiert mit den Regionen von Rhodopsin, die ihre Konformation nach dieser Aktivierung ändern. Die Aminosäuren 1-29 haben durch Interaktion mit dem C-Terminus regulatorische Funktion (Abb. 1.3., Motive I und II). Die Phosphorylierungs Erkennung soll im Bereich der Aminosäuren 163-191 stattfinden (Abb. 1.3, Motiv III), der mit dem phosphorylierten C-Terminus von Rhodopsin interagiert. Dabei wird der AS Arg 175 die Funktion eines für Phosphorylierung sensitiven Triggers zugeordnet. Nach der Bindung an Rhodopsin soll Arrestin eine konformelle Umordnung erfahren, die in der Mobilisierung einer zweiten, hydrophoben sekundären Bindungsstelle (innerhalb AS 191-355) resultiert (Abb. 1.3, Motiv IV). Der C-terminale Bereich (AS 355-404) übt wiederum durch Stabilisierung der inaktiven Form sowie Kontrolle der Konformationsänderung zur aktiven Form eine regulatorische Funktion aus (Abb. 1.3, Motiv V). Von Gurevich wird postuliert, daß im Arrestin zwei verschiedene Arten von intramolekularen Wechselwirkungen existieren, die nacheinander durch Bindung an P-R\* aufgehoben werden (Gurevich, 1998).

Smith und Mitarbeiter definieren die Aminosäuren 90-140 als primäre Interaktionsregion von Arrestin zu P-R\* mit dem prinzipiellen Bindungsbereich von AS 109-130 (Smith et al., 1999). Dies ist konsistent mit den Ergebnissen von Gurevich (s.o.).

Motiv I	<sup>28</sup> KRDYIDHVERVEPV <sup>50</sup> DGVVLVDPE <sup>50</sup>
Motiv II	<sup>65</sup> FRYGQEDIDVMGLSFRRDL <sup>83</sup>
Motiv III	<sup>161</sup> EDKIPKKSSVRL <sup>178</sup> LIRKVQ <sup>178</sup>
Motiv IV	<sup>286</sup> NNRERRGIALDGKIKHEDT <sup>304</sup>
Motiv V	<sup>372</sup> DENFVFEEFARQNLK <sup>386</sup>

**Abbildung 1.3.:** Die fünf Fingerprint Regionen nach PRINTS, basierend auf den bekannten Arrestin-Sequenzen (entnommen aus: Granzin et al., 1998).

Durch Analyse mit der „Protein Fingerprint Database“ PRINTS (Attwood et al., 1997) ergeben sich für alle bekannten Arrestine fünf auf Aminosäureebene hoch konservierte Motive, als Fingerprint Regionen bezeichnet. Diese befinden sich vornehmlich in der N-terminalen Domäne von Arrestin (Granzin et al., 1998). Da allen Arrestinen eine Rolle in der Regulation von GPCRs zugewiesen wird, ist naheliegend, daß mögliche Interaktionsbereiche zum Rezeptor in diesen Motivregionen zu finden sind.

### 1.4.3. Vorkommen und subzelluläre Verteilung von Arrestinen

Bis April 1999 sind 34 Proteine aus der Familie der Arrestine bekannt und sequenziert (SWISS-PROT). Neben ihrer Rolle bei der Abschaltung der Signaltransduktion im visuellen System von Vertebraten und Invertebraten (Yamada et al., 1990; Smith et al., 1990), scheinen Arrestine auch in anderen G-Protein gekoppelten Systemen eine Bedeutung bei der Inaktivierung der Rezeptoren zu haben. Besonders gut untersucht ist diese Funktion im  $\beta$ -adrenergen System. Das in diesem System beteiligte Arrestin wird als  $\beta$ -Arrestin bezeichnet (Lohse et al., 1990). Nicht-visuelle  $\beta$ -Arrestine werden ubiquitär exprimiert, und sind für die Regulation vieler verschiedener G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCRs) verantwortlich (Krupnick & Benovic, 1998). Ihnen wird u.a. eine bedeutende Rolle in der Internalisierung von Agonist-aktivierten GPCRs zugewiesen (Ferguson et al., 1996; Krupnick & Benovic, 1998; Ferguson & Caron, 1998; Li et al., 1999). Postuliert wird zum einen eine Funktion als Adaptormolekül zwischen Rezeptor und der Clathrin-coated-pit Maschinerie (Goodman et al., 1996) sowie auch eine direkte Bindung an Clathrin (Krupnick et al., 1997) und Inositol Phosphate gezeigt (Gaidarov et al., 1999). Es gibt nun auch direkte Hinweise, daß  $\beta$ -Arrestin die Tyrosin Kinase c-Src zum  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor rekrutiert (Luttrell et al., 1999; Zuker & Ranganathan, 1999).



Man vermutet, daß Arrestin-artige Proteine in allen Ezymkaskaden, die eine Interaktion zwischen G-Protein und Rezeptor zeigen vorkommen, und essentiell für die Regulation des Rezeptors und dessen Adaptation sind. Arrestine konnten mittels Immunodetektion in vielen Geweben nachgewiesen werden. Dazu gehört z.B. die Zirbeldrüse (Kalsow & Wacker, 1978), die Niere (Mirshahi et al., 1992), Erythrozyten und Thrombozyten (Mirshahi et al., 1989; 1991a), Osteoblasten (Bliziotis et al., 1996) und das Gehirn (Sunayashiki-Kusuzaki, et al., 1997). Arrestin-ähnliche Proteine wurden auch z.B. im Tabak (Mirshahi et al., 1991b), in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Jeansonne et al., 1991), und in *Euglena gracilis* (Razaghi et al., 1997) nachgewiesen. Die subzelluläre Verteilung von retinalem Arrestin in den Stäbchen von *Bufo marinus* wurde mittels Immunoelektronenmikroskopie untersucht (Mangini & Pepperberg, 1987). Es zeigte sich, daß sich im Dunkeln der überwiegende Teil des Arrestins im Stäbcheninnensegment befindet. Dies ändert sich jedoch nach Belichtung der Retina. Das Arrestin wandert in das Außensegment der Stäbchen und ist dort mit dem Elektronenmikroskop nach Immunogoldmarkierung sichtbar (Mangini et al., 1994).

#### 1.4.4. Arrestin unter medizinischen Gesichtspunkten

Die Bedeutung von Arrestin in der visuellen Signaltransduktion zeigt sich in der erblichen Form der Nachtblindheit, der Oguchi-Krankheit. Bei einer Reihe von Patienten wurde gefunden, daß mit dieser Krankheit auch eine homozygote Deletion des Nukleotids 1147 im Arrestingen verknüpft ist. Diese erzeugt ein Stop-Codon und führt somit zur vorzeitigen Termination der Proteinsynthese (Fuchs et al., 1995; Nakamachi et al., 1998). Eine Verursachung von Retinitis Pigmentosa durch Mutationen im Arrestingen werden zur Zeit kontrovers diskutiert (Sippel et al., 1998; Nakazawa et al., 1998). Auch bei Patienten, die an multipler Sklerose erkrankt waren, wurden erhöhte Titer der gegen Arrestin gerichteten Serumantikörper nachgewiesen (Ohguro et al., 1993b).

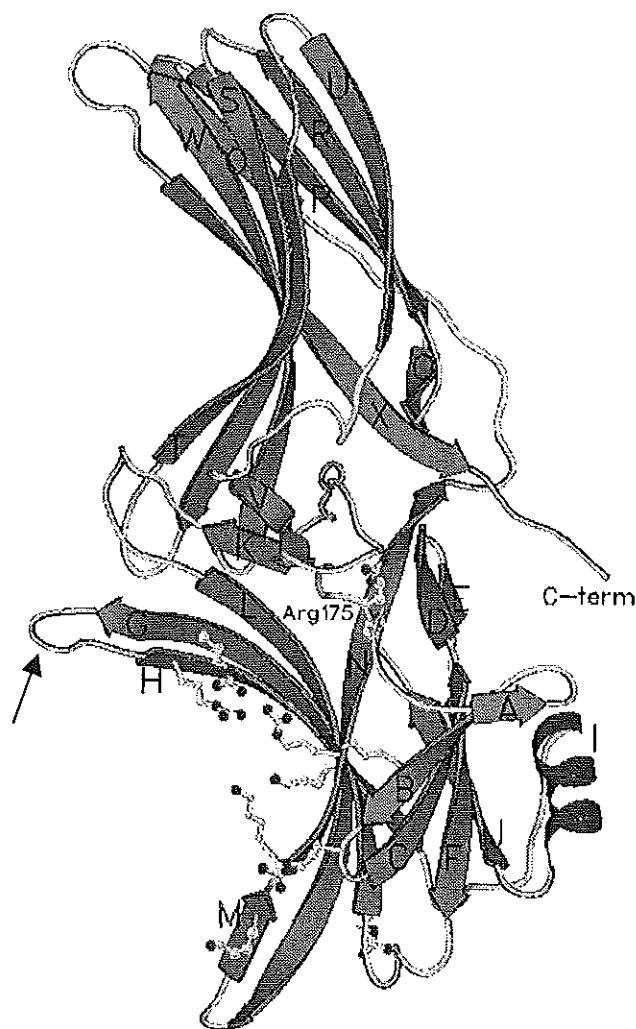
Transgene Mäuse, die kein Arrestin mehr besitzen, können eine vollständige Deaktivierung ihrer Phototransduktionskaskade in einem biologisch relevanten Zeitbereich nicht mehr erreichen (Xu et al., 1997).

### 1.5. Die Röntgenkristallstruktur von Arrestin bei 3.3 Å

Ein Arrestin-Molekül hat die Größe von etwa  $90 \times 39 \times 50 \text{ Å}^3$  (Abb. 1.4) und ist aus zwei Domänen, bestehend aus antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern und einer kurzen N-terminalen  $\alpha$ -Helix

aufgebaut. Die Domänen sind verknüpft durch einen flexiblen Bereich, der als Scharnier-Region („hinge region“) bezeichnet wird.

Die asymmetrische Einheit der Elementarzelle enthält vier Moleküle (A bis D), die jeweils paarweise (A und C sowie B und D) gleich sind. Bei Molekül A und C ist die Elektronendichte ab Aminosäure 368 und bei Molekül B und D ab Rest 363 nicht mehr sichtbar (Granzin et al., 1998). Eine Kontrolle durch SDS-PAGE und Westernblots mit verschiedenen Antikörpern zeigte, daß das kristallisierte Protein die volle Aminosäurenlänge hat und nicht die Spleißvariante p44 ist (3.4.4.). Die in der Elektronendichte nicht sichtbaren Aminosäuren haben eine hohe Flexibilität, die möglicherweise funktional von Bedeutung ist (1.4.2.).

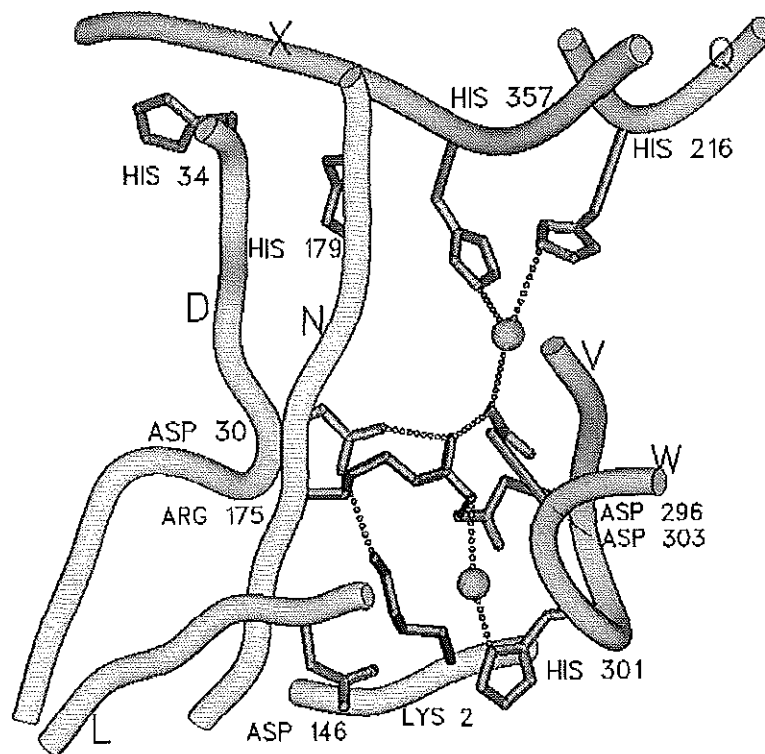


**Abbildung 1.4.:** Die Struktur von Molekül B. Im Bild liegt die C-terminale Domäne oben. Die Seitenketten der Lysine und Arginine sind für die N-terminale Domäne zusätzlich gezeichnet. Der Pfeil bezeichnet die Schleife von Aminosäure 68 bis 78 zwischen den  $\beta$ -Strängen G und H (entnommen aus: Granzin et al., 1998).

Weitere signifikante Unterschiede treten zwischen den nicht-equivalenten Paaren hauptsächlich in einer Loop-Region (Schleife von Aminosäuren 68 bis 78) auf. Bei den Molekülen B und D hat diese Schleife eine „offene“ Form (Abb. 1.4., Pfeil). In Molekül A

bzw. C ist die Schleife von 68 bis 78 zwischen den  $\beta$ -Strängen G und H der N-terminalen konkaven Seite vorgelagert. Diese Konformation könnte die inaktive Form darstellen. Alle Abweichungen zwischen den Molekülen sind durch Packungseffekte bei der Kristallbildung zu erklären. Möglicherweise deuten sie auf, durch Interaktion mit P-R\* induzierte, Konformationsänderungen hin.

Die N-terminale Kuppel hat an der Basis einen Durchmesser von 35 Å und eine Tiefe von 24 Å, der C-terminale Kuppeldurchmesser ist im Vergleich mehr als 10 Å kleiner. Wie bereits diskutiert wurde vorgeschlagen, daß die Phosphorylierungs-Erkennungs-Domäne vornehmlich N-terminal im Bereich der Aminosäuresequenz 163 bis 191 liegt (1.4.2.).



**Abbildung 1.5.:** Die Umgebung von Arg175. Die gepunkteten Linien sind Wasserstoffbrücken bzw. Salzbrücken. Die 2 Kugeln stellen Wassermoleküle dar (entnommen aus: Granzin et al., 1998).

Zusätzlich wurde dem Arg 175 ( $\beta$ -Strang N) eine Schlüsselrolle zugeordnet. In der vorliegenden Kristallstruktur wird das Arg 175 in eine unübliche Rotamer-Konformation gezwungen. Dafür verantwortlich sind die Salzbrücken zu Asp 30, Asp 296 und Asp 303, sowie der zusätzlichen Wasserstoffbrücke zu einem Wassermolekül (Abb. 1.5.). Wenn das Arg 175 die beschriebenen Funktionen als Phosphorylierungs-sensitiver Trigger (1.4.2.) ausüben soll, müssen die Salz- und Wasserstoffbrücken gelöst werden. Hierdurch könnte die Aminosäure in Standardrotamer-Konformation übergehen und wäre dem C-terminalen Ende

des Rhodopsins zugänglich. Ab Lys 176 verdrillt sich der  $\beta$ -Strang N und verläßt die konkave Seite. Dadurch können die darauf folgenden Aminosäuren nicht mehr in direkten Kontakt mit Rhodopsin treten. Die Aminosäuren Lys 176 bis Gly 185 verlaufen durch die Scharnier-Region auf die Rückseite der zweiten Domäne. Diese strukturellen Eigenschaften weisen darauf hin, daß die Phosphorylierungs-Erkennungs-Region wahrscheinlich nur bis Aminosäure 175 reicht und nicht, wie in der Literatur beschrieben, bis Rest 191 (Gurevich, 1998). Die Reste 176 bis 191 haben bisher keine offensichtliche Funktion. Ihre Lage in der flexiblen Scharnier-Region weist aber auf eine mögliche Beteiligung an der Trigger-Funktion des Arg 175 hin.

Eigenschaften der anderen postulierten funktionalen Bereiche in Arrestin sind ohne die dreidimensionale Struktur von P-R\* sehr spekulativ. Der modellierte Arrestin-Rhodopsin-Komplex (Granzin et al., 1998) deutet an, daß die Dimensionen der N-terminalen Domäne von Arrestin ausreichen, um die cytoplasmatischen Schleifen von Rhodopsin vollständig gegen Transducin abzuschirmen.

Auf Basis der Röntgenkristallstruktur von Arrestin in Kombination mit den Literaturdaten (1.4.2.) war es möglich, die mit dem phosphorylierten C-terminalen Bereich von Rhodopsin wechselwirkende Phosphorylierungs-Erkennungs-Domäne zu lokalisieren. Die genaue Lokalisation der Bindungsstellen am Rhodopsin konnten noch nicht geklärt werden. Krupnick und Mitarbeiter fanden jedoch, daß das Arrestin an den ersten und dritten Loop des Rhodopsins bindet (Krupnick et al., 1994).

## 1.6. Zielsetzungen der Arbeit

Die Aufklärung des Bindungsmechanismus von Arrestin an phosphoryliertes und lichtaktiviertes Rhodopsin leistet einen bedeutenden Beitrag zum Verständnis der Regulation von GPCRs. Eine wichtige Voraussetzung dafür ist die Raumstruktur von Arrestin. Die vorliegende Röntgenstruktur weist jedoch in dem für die Spezifität entscheidenden C-terminalen Bereich ein Defizit in der Elektronendichte auf. Eine definitive Aussage über interagierende Bereiche zwischen Arrestin und Rhodopsin ist nur durch die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse des Arrestin-Rhodopsin-Komplexes möglich.

Aus Rinderaugen läßt sich Arrestin durch etablierte Reinigungsverfahren zwar in großen Mengen gewinnen (Wilden et al., 1986b; Buczylo & Palczewski, 1993), das so gewonnene retinale Arrestin zeigt jedoch eine große Mikroheterogenität. Diese wird zum großen Teil auf die Herkunft aus verschiedenen Tieren und durch Unterschiede in der Aminosäuresequenz (Shinohara et al., 1987; Yamaki et al., 1987; I. Weyand, Dissertation, 1988) zurückgeführt. Auch spielen Differenzen in Acetylierung und Proteolyse des N-Terminus eine Rolle.

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines heterologen Expressionssystems für Arrestin aus dem Rinderauge. Durch rekombinante Herstellung von homogenem und funktionalem wildtypischen Arrestin, sollte eine Grundlage für die anschließende Erzeugung von Arrestin-Mutanten geschaffen werden. Diese Proteine können auch in der Kristallisation des Arrestin-Rhodopsin-Komplexes Verwendung finden.

Durch Modifikation der wildtypischen Sequenz mit verschiedenen Peptiden (z.B. 6 Histidinen) kann rekombinantes Arrestin affinitätschromatographisch gereinigt werden. Unter der Voraussetzung, daß die angenommene Konformationsänderung der inaktiven in die aktive Form von Arrestin durch Interaktion mit Rhodopsin bewirkt wird, sollte ein heterolog exprimiertes, über Affinitätspeptide gereinigtes Arrestin zu 100% in der postulierten inaktiven Konformation vorliegen. Zudem ist bei der Reinigung über die Modifikationen des C-Terminus sichergestellt, daß nur vollständig translatierte Proteine isoliert werden.

Durch C-terminale Veränderungen an Arrestin werden die Voraussetzungen geschaffen, den C-Terminus selektiv z.B. mittels Schweratomderivaten zu markieren und zu lokalisieren.

Anhand der publizierten, nativen Röntgenstruktur werden Mutanten erstellt, die einen Beitrag zur Aufklärung der Arrestin-Rhodopsin-Bindung leisten können.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Geräte und Zubehör**

#### **Agarosegelelektrophorese:**

Power Pack P25, Biometra, Göttingen  
Laufkammer Bio Max (QS710), Kodak,  
Laufkammer GMA 200, Pharmacia, Uppsala, Schweden

#### **DNA-Sequenzierung:**

Power Supply EPS 3500, Pharmacia, Uppsala, Schweden  
GATC 1500 Direct Blotting Electrophoresis DNA-Sequencer mit GATC CCU  
1500 Schrittmotor und GATC-Tube, GATC Gesellschaft, Konstanz  
LI-COR 4200 Automatic Sequencer, MWG-Biotech, Ebersberg

#### **Geldokumentationssystem:**

Gel Doc 1000, Molecular Analyst, BioRad, München

#### **pH-Meter:**

pH-Meter 766 Calimatic, Knick, Berlin  
mit pH-Elektrode von Schott Geräte, Hofheim a. Ts.

#### **Photometer:**

GeneQuant, Pharmacia, Uppsala, Schweden  
UV-120-02, Shimadzu, Japan  
UV2101PC, Shimadzu, Japan

#### **SDS-Gelelektrophorese:**

Model 1000/500 Power Supply, BioRad, München  
Power Supply 2301 Macrodrive 1, LKB, Bromma, Schweden  
Protean II xi Cell, BioRad, München  
2050 Midget, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, U.S.A.

#### **Thermocycler:**

PTC-200, MJ Research, Watertown, U.S.A.

#### **Ultraschallgeräte:**

Labsonic L mit Nadel 40TL, Braun, Melsungen  
Ultraschallbad Transsonic Digital, Elma, Singen

#### **UV-Tisch:**

TFL20M, Biometra, Göttingen  
Mini-Transilluminator mit UV-Weißlicht-Konvertierungsplatte, BioRad, München

**Zellaufschlußgeräte:**

French Press Hydraulikpresse, SLM Aminco, Rochester, U.S.A.  
 French Press Zelle 20K mit Schnellfüllstand, SLM Aminco, Rochester, U.S.A.  
 French Press Zelle 40K, handbefüllbar, SLM Aminco, Rochester, U.S.A.

**Zentrifugen:**

Optima TL Ultrazentrifuge mit Rotor TLA 45, Beckman, Palo Alto, U.S.A.  
 Optima L-70K Ultrazentrifuge mit Rotor Ti70, Beckman, Palo Alto, U.S.A.  
 Amicon Mikrozentrifuge MC-13, Heraeus, Osterode  
 Zentrifuge 5414, Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg  
 Kühlzentrifuge Biofuge 13 R mit Rotor HFA 14.2, Heraeus, Osterode  
 Megafuge 1.0 R mit Rotor BS4402/A, Heraeus, Osterode  
 Centricon H-401 mit Rotor A8.24, Kontron, Hermle, Gosheim  
 Kühlzentrifuge 5417R, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg  
 Sorvall RC5C mit Rotoren SS34, GS, KA-9000, DuPont, Wilmington, U.S.A.  
 Beckman J2-21 mit den Rotoren JA20 und JS-13, Palo Alto, U.S.A.

## 2.2. Verbrauchsmaterialien

**Chemikalien und Reagenzien:**

Sofern nicht anders angegeben, haben alle Chemikalien die Qualität „p.a.“ oder „reinst“. Die Lösungen werden mit hochreinem Wasser (Millipore-Qualität) angesetzt.

Acrylamid-Bisacrylamid (Gel 30)	Roth
Adeninsulfat	Sigma
ATP, di-Natrium-Salz	Sigma
Agar	Difco, ICN
Agarose (Standard)	Sigma, Biozym
Agarose, Metaphor	Biozym
AHT, Hydrochlorid	Acros
L-Alanin	Merck, Fluka
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad
Ampicillin	Boehringer Mannheim
Aprotinin	Sigma
L-Arginin	Sigma
L-Asparagin	Sigma, Fluka
L-Asparaginsäure	Sigma
Bacto Pepton	Difco
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Aldrich
2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure	Aldrich
Brain Heart Infusion (BHI) Broth	Difco
Brain Heart Infusion (BHI) Agar	Difco
Bromphenolblau	Bio-Rad
BSA	Serva
Calciumchlorid	Merck
Di- $\mu$ -chloro-dichlorobis(ethylen)diplatinum (II)	Strem

Chymostatin	Sigma
Citronensäure	Merck
Complete™, EDTA-free	Boehringer Mannheim
Complete™	Boehringer Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva
L-Cystein	Sigma, Merck
Desthiobiotin	Sigma
Diaminobiotin	Sigma
Dimethylformamid	Merck
DMSO	Merck
DTT	Merck
dNTPs	New England Biolabs
EDTA	Merck
Emulphogen	Sigma
Essigsäure	Riedel de Haen
Ethanol, absolut	Riedel de Haen
Ethanol, vergällt	Hoffmann
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylenglykol	Serva
D (+) Galaktose	Sigma, Aldrich,
D (+) Glukose	Sigma
L-Glutamin	Sigma
L-Glutaminsäure	Sigma
Glutathion, reduziert	Sigma, Merck
GTP, Natriumsalz	Sigma
Glycerin	Sigma
L-Glycin	Sigma
Guanidiniumhydrochlorid	Merck
HABA	Sigma
Harnstoff	Merck
HEPES	Sigma
Hefe-Extrakt (Yeast Extract)	Difco
L-Histidin	Sigma
Imidazol	Sigma
Inositol	Sigma
Di- $\mu$ -Iodobis(ethylendiamin)-diplatin(II)nitrat PIP	Strem
IPTG	Eurogentech
L-Isoleucin	Sigma
Isopropanol	Riedel de Haen
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
di-Kaliumhexachloroplatinat	Sigma
di-Kaliumtetrachloroplatinat	Sigma
Kaliumhydroxid	Merck
Kanamycin-monosulfat	Sigma
Kupfersulfat	Merck
L-Leucin	Sigma
Leupeptin	Sigma
Lithiumacetat	Sigma
L-Lysin	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Riedel de Haen
L-Methionin	Sigma
NADH	Boehringer Mannheim
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Merck
tri-Natriumcitrat	Merck



Natriumdihydrogenphosphat	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Nickelsulfat-hexahydrat	Sigma
Paraffinöl	Merck
Pepton	Oxoid
Pepstatin	Sigma
L-Phenylalanin	Sigma
PIPES	Merck
PMSF	Sigma
Polyethylenglykol 200	Sigma
Polyethylenglykol 1000	Serva
Polyethylenglykol 3350	Sigma
Polyethylenglykol 6000	Serva
Ponceau S	Sigma
L-Prolin	Sigma
D-Raffinose	Aldrich
Rubidiumchlorid	Merck
Saccharose	Merck
Salzsäure	Riedel de Haen
L-Serin	Sigma
SDS	BioRad
D-Sorbitol	Sigma
TEMED	BioRad
L-Threonin	Sigma
Trichloressigsäure	Merck
Tris (Base)	Sigma
Tris (HCl)	Sigma
Tris-Acetat	Sigma
Trypton	Difco
L-Tryptophan	Sigma, Aldrich
Tween 20	Sigma
L-Tyrosin	Sigma
Uracil	Sigma, Aldrich
L-Valin	Sigma
X-Gal	AGS
YNB, ohne Aminosäuren	Difco

**Enzyme:**

Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm)	Boehringer Mannheim
Klenow Fragment der DNA-Polymerase aus <i>E. coli</i>	Boehringer Mannheim
Mung Bean Nuklease	New England Biolabs, Schwalbach
Taq Expand High Fidelity	Boehringer Mannheim
TaqPlus Precision PCR System	Stratagene, Amsterdam, Holland
T4 DNA-Ligase	Gibco/BRL, Karlsruhe
	New England Biolabs, Schwalbach
Thermo Sequenase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Thrombin Protease	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Zymolyase 100T	Seikagaku, Tokyo, Japan

Restriktionsenzyme werden von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach), Gibco/BRL (Karlsruhe), Boehringer Mannheim und Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen.

**Filtereinheiten:**

Supor Acrodisc 32, 0,2 µm oder 0,45 µm, Gelman Sciences, Ann Arbor, U.S.A.  
 Spritzenvorsatzfilter, 0,45 µm PES, Nalgene, Rochester, U.S.A.  
 Bottle Top Filter, 0,2 µm, 150 ml, Nalgene, Rochester, U.S.A.  
 Bottle Top Filter, 0,45 µm, 150 ml, Nalgene, Rochester, U.S.A.  
 Bottle Top Filter, PES 0,45 µm, 150 ml, Nalgene, Rochester, U.S.A.  
 VacuCap 60, 0,2µm, Gelman Sciences, Roßdorf

**Gelfiltrationssäulen zur Probenentsalzung:**

Column PD-10, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg  
 Econo-Pac 10DG Columns, BioRad, München

**Molekulargewichts-Standards für die Elektrophorese:**Protein:

Rainbow, high molecular weight	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SDS-PAGE, Molecular Weight Standard, Broad Range	BioRad, München
10 kDa-Ladder	Gibco/BRL, Karlsruhe
BenchMark™, Protein Ladder	Gibco/BRL, Karlsruhe
BenchMark™, Prestained Protein Ladder	Gibco/BRL, Karlsruhe
Wide Range, multicolored	NEN™ Life Science, Boston, U.S.A.

DNA:

1 kb Ladder	Gibco/BRL, Karlsruhe
λ-DNA BstEII Digest	New England Biolabs, Schwalbach
Längenmarker VII	Boehringer Mannheim

**Rotlichtquelle:**

Glühbirne PF712, Philips, Kassel

**Säulenmaterialien für die Chromatographie:**

Chelating Sepharose Fast Flow Media, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg  
 Glutathion Sepharose 4B, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg  
 StrepTactin Sepharose, IBA, Göttingen  
 Streptavidin Sepharose, Biometra, Göttingen  
 Mono-Q HR 5/5 FPLC-Säule, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

**Ultrafiltrationseinheiten:**

Fugisep-Maxi 10.000, 30.000; Sevatec, Witten oder Membrapure, Bodenheim  
 Fugisep-Midi 10.000, 30.000; Sevatec, Witten oder Membrapure, Bodenheim  
 Fugisep-Mini 10.000, 30.000; Sevatec, Witten oder Membrapure, Bodenheim  
 Centricon-10, -30; Amicon, Beverly, U.S.A.  
 Microcon-10, -30; Amicon, Beverly, U.S.A.  
 Centriplus-10, -30; Amicon, Beverly, U.S.A.

## 2.3. Puffer, Lösungen und Medien

### 2.3.1. Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben, werden alle Lösungen und Puffer in hochreinem Wasser angesetzt.

#### Affinitätschromatographie:

Arrestin-Puffer:	100 mM PIPES, 800 mM NaCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7,0
PBS:	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,3
Waschpuffer W:	100 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 0,02 % (w/v) NaN <sub>3</sub> , pH 8,0
Elutionspuffer E:	100 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 3 mM Diaminobiotin, 0,02 % (w/v) NaN <sub>3</sub> , pH 8,0
Puffer 10/100:	10 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,5
Puffer 10/400:	10 mM HEPES, 400 mM NaCl, pH 7,5
Puffer 10/800:	10 mM HEPES, 800 mM NaCl, pH 7,5
His-Bindungspuffer:	5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,9
His-Waschpuffer:	60 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,9
His-Elutionspuffer:	1 M Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,9
His-Strippuffer:	100 mM EDTA, 500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,9
His-Chargepuffer:	50 mM NiSO <sub>4</sub>
Strep-Elutionspuffer:	2,5 mM Desthiobiotin, 10 mM HEPES, 400 mM NaCl, pH 7,5
Strep-Regenerationspuffer:	1 mM HABA, 10 mM HEPES, 400 mM NaCl, pH 7,5
Regenerationspuffer:	6 M GuCl

#### Agarosegelelektrophorese:

Ethidiumbromidlösung:	10 mg/ml Ethidiumbromid
TAE:	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0
DNA-Probenpuffer:	50 % Saccharose, 1x TAE, 0,25 % Bromphenolblau

#### Isolierung von Arrestin aus Rinderaugen:

Lösung 1:	0,07 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,07 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,1 mM EDTA; pH 7,2
Lösung 2:	10 mM HEPES; 0,2 mM EDTA; pH 7,2

Lösung 3:	10 mM HEPES; 400 mM KCl; pH 7,2
Lösung 4:	10 mM HEPES; 800 mM KCl; pH 7,2

**Kristallisation von Arrestin:**

Puffer P6.1:	18 mM HEPES; 30 % (v/v) Ethylenglycol; 18 % (v/v) PEG 200; 3 % (v/v) PEG1000; 8 % (v/v) PEG 6000; 500 mM KCl; 0,02 % (w/v) NaN <sub>3</sub> ; pH 7,2
Grundpuffer:	100 mM HEPES; 800 mM NaCl; pH 7,2
Umsetzungspuffer:	28 mM HEPES; 30 % (v/v) Ethylenglycol; 18 % (v/v) PEG200; 3 % (v/v) PEG1000; 8 % (v/v) PEG 6000; 1,3 M KCl; 4 mM MgCl <sub>2</sub> ; 8 mM EGTA; 0,02 % (w/v) NaN <sub>3</sub> ; pH 7,2
Reservoir-Puffer 10:4:	15,6 mM HEPES; 21 % (v/v) Ethylenglycol; 12,9 % (v/v) PEG200; 2,1 % (v/v) PEG1000; 5,7 % (v/v) PEG 6000; 622 mM KCl; 0,02 % (w/v) NaN <sub>3</sub> ; pH 7,2
Reservoir-Puffer 10:10:	14 mM HEPES; 15 % (v/v) Ethylenglycol; 9 % (v/v) PEG 200; 1,5 % (v/v) PEG1000; 4 % (v/v) PEG 6000; 675 mM KCl; 0,02 % (w/v) NaN <sub>3</sub> ; pH 7,2

**Lösen von DNA:**

TE:	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0
Trispuffer:	10 mM Tris, pH 8,5

**Phosphorylierte Membranen (PMBs):**

Puffer 1:	70 mM NaPP, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7,2
Puffer 2:	10 mM HEPES, 120 mM KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7,2
Puffer 3:	5 mM HEPES, 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7,2
Puffer 4:	10 mM HEPES, 120 mM KCl, pH 7,2

**Polyacrylamidgelelektrophorese:**

2x SDS-Probenpuffer:	124 mM Tris, 4 % (w/v) SDS, 10 % $\beta$ -Mercaptoethanol, 20 % (v/v) Glycerin, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
5x Harnstoffprobenpuffer:	8 M Harnstoff, 0,2 M Tris/HCl, 2 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,2 M DTT
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS, pH 6,8

Trenngelpuffer:	1,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS, pH 8,8
Laufpuffer :	192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS
Coomassie-Färbelösung:	0,05 % (w/v) Coomassie R250, 10 % (v/v) Essigsäure, 25 % (v/v) Ethanol
Entfärber:	10 % (v/v) Essigsäure

### **Präparation von Stäbchenaußensegmenten (ROS-Membranen) aus Rinderaugen:**

0,6 M KCl-Puffer:	0,6 M KCl; 20 mM HEPES, pH 7,0
0,3 M KCl-Puffer:	0,3 M KCl; 10 mM HEPES; 0,1 mM EDTA; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,5 mM CaCl <sub>2</sub> ; pH 7,0
50 % Saccharose-Puffer:	50 % (w/v) Saccharose; in 0,3 M KCl-Puffer
48 % Saccharose-Puffer:	48 % (w/v) Saccharose; in 0,3 M KCl-Puffer
Saccharoselösung mit einer Dichte von $\rho = 1,10$ g/ml:	148 ml 50 % Saccharose-Puffer + 252 ml 0,3 M KCl-Puffer
Saccharoselösung mit einer Dichte von $\rho = 1,125$ g/ml:	217 ml 50 % Saccharose-Puffer + 183 ml 0,3 M KCl-Puffer
Saccharoselösung mit einer Dichte von $\rho = 1,145$ g/ml:	258 ml 50 % Saccharose-Puffer + 142 ml 0,3 M KCl-Puffer

### **Transformation von *S. cerevisiae*:**

TE-LiAc:	10 mM Tris/HCl, 0,1 mM EDTA pH 7,6, 100 mM LiAc
TE-LiAc-PEG:	10 mM Tris/HCl, 0,1 mM EDTA pH 7,6, 100 mM LiAc, 40 % (w/v) PEG3350

### **Westernblotanalyse:**

Blot-Puffer:	39 mM Glycin, 48 mM Tris (Base), 20 % (v/v) Methanol
Ponceau S-Färbelösung:	0,2 % (w/v) Ponceau S, 3 % (w/v) Trichloressigsäure
TBS:	20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6
TBS-T:	20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6, 0,1 % (v/v) Tween 20
Stripping-Lösung:	60 mM Tris, 100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, 2 % (w/v) SDS, pH 6,8

### **Zellaufschluß von *S. cerevisiae* mit Glasperlen nach Sphäroplastierung:**

SCE-Puffer:	1 M Sorbitol, 0,1 M Na-Citrat, pH 5,8, 10 mM EDTA
Protease Inhibitor Cocktail:	1 mM PMSF, 10 $\mu$ g/ml Aprotinin, 10 $\mu$ g/ml Chymostatin, 50 $\mu$ g/ml Leupeptin, 10 $\mu$ g/ml Pepstatin A

### 2.3.2. Medien

Wenn nicht anders angegeben, werden die Medien autoklaviert (121 °C, 20 min.). Medienzusätze (Kohlenstoffquellen, Antibiotika und andere Zusätze) werden sterilfiltriert und nach dem Abkühlen zugesetzt.

#### Medienzusätze:

Ampicillin - Stammlösung:	200 mg/ml Ampicillin in Wasser, sterilfiltriert
Kanamycin - Stammlösung:	50 mg/ml Kanamycin in Wasser, sterilfiltriert
IPTG-Stammlösung:	1 M in Wasser, sterilfiltriert
AHT-Stammlösung:	2 mg/ml in Dimethylformamid, sterilfiltriert
CuSO <sub>4</sub> -Stammlösung:	500 mM in Wasser, sterilfiltriert
Galaktoselösung:	40 % (w/v) in Wasser, sterilfiltriert
Glukoselösung:	40 % (w/v) in Wasser, sterilfiltriert
Raffinoselösung:	40 % (w/v) in Wasser, sterilfiltriert

#### Bakterienmedien:

dYT:	1,6 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 0,5 % (w/v) NaCl
LB:	1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,5
BHI	52 g BHI pro 1 Medium

Für Agarplatten wurde dem Medium 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

#### Hefemedien:

Minimalmedium SC: 0,67 % (w/v) YNB ohne Aminosäuren, 2 % (w/v) Kohlenstoffquelle (Glukose oder Galaktose oder Raffinose) 0,1 % (w/v) DROP-OUT-MIX ohne Uracil bzw. ohne Leucin

Vollmedium YP: 2 % (w/v) Pepton, 1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 2 % (w/v) Kohlenstoffquelle

Für Agarplatten wird dem Medium 2 % (w/v) Agar zugesetzt.

DROP-OUT-MIX (je nach Bedarf ohne Uracil bzw. ohne Leucin ansetzen):

Adenin 0,5 g, Alanin 2,0 g, Arginin 2,0 g, Asparagin 2,0 g, Asparaginsäure 2,0 g, Cystein 2,0 g, Glutamin 2,0 g, Glutaminsäure 2,0 g, Glycin 2,0 g, Histidin 2,0 g, Inositol 2,0 g, Isoleucin 2,0 g, Leucin 10,0 g, Lysin 2,0 g, Methionin 2,0 g, Phenylalanin 2,0 g, Prolin 2,0 g, Serin 2,0 g, Threonin 2,0 g, Tryptophan 2,0 g, Tyrosin 2,0 g, Uracil 2,0 g, Valin 2,0 g

Anstelle von DROP-OUT-MIX können auch, je nach auxotrophem Bedarf, Zusätze aus 100fach konzentrierten Stammlösungen hinzugefügt werden:

Adenin 0,2 mg/l; Arginin; 0,2 mg/l; Leucin 0,3 mg/l; Lysin 0,3 mg/l Uracil 0,2 mg/l Tryptophan 0,2 mg/l

### 2.3.3. Dokumentation der Ergebnisse

Agarosegele und Sypro-Orange-gefärbte SDS-Gele werden mit dem GelDoc1000 (BioRad) dokumentiert, in machen Fällen werden Polaroidbilder erstellt (Polaroid MP-4 Land Camera mit Polapan-Filmen). Die Dokumentation von Silber- oder Coomassie-gefärbten SDS-Gelen erfolgt unter Verwendung des UV-Weißlicht-Konvertierungsschirmes mit dem GelDoc1000. Die Bearbeitung und Auswertung von Daten erfolgt mit den Programmen CorelDraw7, AdobePhotoshop, Excel und MolecularAnalyst (BioRad, München).

Kristallisationsansätze werden unter dem Polarisationsmikroskop (Olympus SZH10) mit einer Olympus OM-4Ti-Kamera und Kodak Ektachrom 320T Filmen photographiert.

## 2.4. Organismen und Wachstumsbedingungen

### 2.4.1. Kulturbedingungen für *E. coli* und *S. cerevisiae*

#### *Escherichia coli*

*E. coli* wird, wenn nicht anders angegeben, in Flüssigmedium (LB, dYT oder BHI) für 12 bis 16 h bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 120 Upm angezogen oder auf Agarplatten bei 37 °C über Nacht inkubiert.

#### *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* wird auf Agarplatten 2-4 Tage bei 30°C angezogen. Die Kultivierung in Flüssigmedium (YP oder SC) erfolgt im Schüttelinkubator (200 bis 300 Upm) bei 30°C, bis die gewünschte Zelldichte erreicht ist.

### 2.4.2. Bestimmung der Zelldichte von bakteriellen bzw. Hefe-Flüssigkulturen

Als relatives Maß für die Zelldichte wird die Optische Dichte der Kulturen im Photometer (UV-120-02, Shimadzu) bei 600 nm bestimmt (OD<sub>600</sub>). Bei *S. cerevisiae* entspricht eine OD<sub>600</sub> von 1,0 etwa  $1,8 \times 10^7$  Zellen pro ml.

### 2.4.3. Organismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen sind in den Tabellen 2.1 und 2.2 beschrieben.

**Tabelle 2.1.:** Verwendete *Saccharomyces cerevisiae* Stämme und ihre Eigenschaften

Stamm	relevante genetische Marker	Referenz/Herkunft	Paarungstyp
F11	leu2-3, 112, ura3-52, his3-Δ200, suc2-Δ9	F.Becker, U.S.A.	Mat α
SEY6210	leu2-3, 112, ura3-52, his3-Δ200, trp1-Δ901, lys2-801, suc2-Δ9	F.Becker, U.S.A. (Wilsbach & Payne, 1993)	Mat α
YPH500	leu2-Δ1, ura3-52, his3-Δ200, trp1-Δ63, lys2-80, ade2-106	Stratagene	Mat α
BJ2168	prc1-407, prb1-1122, pep4-3, leu2, trp1, ura3-52, gal2	YGSC, U.S.A. (Jones, 1990)	Mat a
BJ2407	prc1-407, prb1-1122, pep4-3, leu2, trp1, ura3-52, gal2	YGSC, U.S.A. (Jones, 1990)	Mat a/α

**Tabelle 2.2.:** Verwendete *Escherichia coli* Stämme und ihre Eigenschaften

Stamm	relevante genetische Marker	Referenz	Herkunft
DH5α	<i>F endA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 thi-1 λ<sup>-</sup> recA1 gyrA96 relA1 deoR [lacZYA-argF]-U169 (φ80dlacZDM15)</i>	Hanahan, 1985	ITC Biotechnology GmbH
M15 [pREP4]	<i>F<sup>+</sup> Nat<sup>S</sup> Str<sup>S</sup> rif<sup>S</sup>, lac<sup>-</sup> ara<sup>-</sup> gal<sup>-</sup> mtl<sup>-</sup> F<sup>+</sup> recA uvr</i>	Villarejo & Zabin, 1974	Qiagen
JM109	<i>E14-(McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 relA1 D (lac-proA [F traD36 proAB lacI<sup>q</sup>ZDM15 ]</i>	Yanish-Perron et al., 1984	Stratagene
XL1-Blue	<i>recA1 gyrA96 endA1 thi-1 hsdR17 lac [F<sup>+</sup> proAB lacI<sup>q</sup>ZDM15 Tn10(Tetr)] supE44 relA1</i>	Bullock et al., 1987	Stratagene
Top10	<i>F<sup>+</sup> mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) deoR φ80dlacZDM15 DlacX74 recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Invitrogen	Invitrogen
W3110	<i>F<sup>-</sup> trpA23 xyl<sup>-</sup> glyS<sub>L</sub></i>	Hill & Harnish, 1981	Laborsammlung
BL21::DE3	<i>B F<sup>+</sup> dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)gal l (DE3)</i>	Studier & Moffat, 1986	Novagen
BL21::DE3 [pLysS]	<i>B F<sup>+</sup> dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)gal l (DE3) [pLysS]</i>	Studier, 1991	Novagen
BL21::DE3 [pLysE]	<i>B F<sup>+</sup> dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)gal l (DE3) [pLysE]</i>	Studier, 1991	Novagen



#### 2.4.4. Stammhaltung

Die kurzfristige Lagerung von Organismen erfolgt auf Agarplatten bei 4 °C, die langfristige bei -70 °C wie im folgenden näher erläutert:

600 µl einer über Nacht in Selektionsmedium angezogenen Kultur werden mit 40 % (v/v) sterilem Glycerin versetzt und bei -70 °C eingefroren. Zum Ansetzen einer neuen Kultur wird etwas gefrorene Substanz von der Oberfläche abgekratzt und zur Anzucht auf einer Agarplatte ausgestrichen oder in Flüssigmedium resuspendiert.

### 2.5. Überexpression von Proteinen in *E. coli*: Kulturbedingungen, Zellaufschluß und Herstellung von klaren Zellysaten

#### *Kulturbedingungen*

Die Anzucht und Expression erfolgt stets in Selektionsmedium, wobei Antibiotika in Abhängigkeit vom verwendeten Stamm und Expressionsvektor zugegeben werden. Die Hauptkultur wird aus einer über Nacht Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von etwa 0,15 angeimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 weiter inkubiert. Die Kultivierungstemperatur der Hauptkultur liegt nach der Induktion zwischen 20 °C und 37 °C, je nach Experiment, und ist im einzelnen angegeben. Die Induktion der Expression erfolgt in Abhängigkeit des verwendeten Expressionsvektors mit 0,05 mM–1 mM IPTG (Endkonzentration) oder 0,2 µg/ml AHT (Endkonzentration). Die Induktionsdauer variiert je nach Versuch und ist jeweils angegeben. Die Zellen werden durch 15 min Zentrifugation bei 4 °C und 6000 Upm geerntet, in etwa 1/100 Kulturvolumen Wasser resuspendiert, eventuell aliquotiert und nach erneuter Sedimentation bei -70 °C eingefroren und gelagert.

#### *Zellaufschluß*

Das gefrorene Zellpellet wird in 1/25 Kulturvolumen Zellaufschlußpuffer aufgetaut und resuspendiert. Der Zellaufschlußpuffer ist im einzelnen angegeben und variiert je nach Versuchsbedingungen. Die Zellsuspension wird auf Eis so lange mit 30 sek Pulsen einer Ultraschallnadel (Labsonic L von Braun, kleine Nadel TL40) behandelt, bis der Zellaufschlußgrad über 90 % liegt. Dies wird in regelmäßigen Abständen unter einem Durchlichtmikroskop (Zeiss) kontrolliert.

***Herstellung von klaren Zellysaten (Überständen)***

Das Zellysate wird durch Zentrifugation bei 4 °C, 20000 Upm (SS34 Rotor) von den unlöslichen Bestandteilen getrennt. Kleine Partikel und Schwebestoffe werden anschließend mittels Filtration durch eine 0,45 µm Filtrationseinheit aus der Lösung entfernt (Überstand 1). Zur Reextraktion wird das Pellet in einem halben Volumen Zellaufschlußpuffer resuspendiert und 5 mal 1 min auf Eis mit dem Ultraschallstab behandelt. Diese Suspension wird ebenso wie zuvor das Zellysate durch Zentrifugation und Filtration von unlöslichen Bestandteilen getrennt (Überstand 2).

**2.5.1. Herstellen von Proteinextrakten aus *E. coli* für analytische Zwecke**

Die Zellen einer 25 ml Kultur werden geerntet und in 1 ml Zellaufschlußpuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wird 3 mal 30 sek auf Eis sonifiziert (Labsonic L von Braun, kleine Nadel TL40). Anschließend werden die unlöslichen Bestandteile in einer Mikrozentrifuge bei 4 °C für 15 min mit 13.000 Upm durch Zentrifugation abgetrennt. Das Pellet wird erneut in 1 ml Zellaufschlußpuffer resuspendiert und wie oben beschrieben sonifiziert. Die Analyse der löslichen und unlöslichen Fraktion (Überstand und Pellet) erfolgt mittels SDS-PAGE (2.8.1.).

**2.5.2. Selektiver Aufschluß des Periplasmatischen Raums von *E. coli***

Die Zellen einer Expressionskultur werden durch Zentrifugation geerntet (6000 Upm, 4 °C, 15 min) und das Pellet in 1/100 Kulturvolumen Fraktionierungspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub>) resuspendiert. Die Zellsuspension für 30 min auf Eis inkubiert. Im Allgemeinen wird unter diesen Bedingungen die äußere Membran von *E. coli* zur Freisetzung der löslichen Komponenten des Periplasmas ausreichend permeabilisiert. Zur Abtrennung der entstandenen Sphäroplasten wird die Suspension während 15 min bei 4°C und 13000 Upm in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der klare Überstand wird vorsichtig abgenommen und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Der periplasmatische Extrakt wird mittels SDS-PAGE (2.8.1.) und Westernblot (2.8.3.) analysiert. Die Sphäroplasten werden wie unter 2.5. beschrieben zur Herstellung von löslicher und unlöslicher Fraktion behandelt.

## 2.6. Überexpression von Proteinen in *S. cerevisiae*: Kulturbedingungen, Zellaufschluß und Herstellung von klaren Zellysaten

### *Kulturbedingungen*

Die Kulturbedingungen für die Expression in *S. cerevisiae* wurden für die Verwendung des Stammes F11 optimiert (3.2.3.). Aufgeführt sind hier die auf Zellmasse optimierten und verwendeten Bedingungen:

Die Hauptkulturen werden aus fast stationären Vorkulturen ( $OD_{600} \sim 8 - 10$ ) in Minimalmedium ohne Leucin auf eine  $OD_{600}$  von etwa 4 - 5 angeimpft. Dafür wird die entsprechende Vorkultur mit dem gleichen Volumen frischen Minimalmediums ohne Leucin gemischt und so auf sterile Kolben verteilt, daß maximal ein Drittel des Kolbenvolumens erreicht wird. Die Kulturen werden bei 200 Upm bis 300 Upm (je nach Inkubator) und 30 °C mindestens eine Stunde weiterinkubiert und anschließend die Expression induziert. Die Induktion erfolgt je nach Expressionsvektor durch Zugabe von 0,5 mM  $CuSO_4$  (Endkonzentration) oder 2 % Galaktose (Endkonzentration). Die Kohlenstoffquelle der Vor- und Hauptkulturen richtet sich nach dem verwendeten Expressionsvektor. So wird bei Induktion mit  $CuSO_4$  stets Galaktose verwendet, bei Induktion mit Galaktose jedoch Raffinose.

Die Induktionszeit beträgt etwa 5 Stunden. Am Ende dieser Zeit ist die  $OD_{600}$  noch deutlich unter 10 und die Kultur noch in der logarithmischen Phase (3.2.3.1.). Die tatsächlich erreichte Zelldichte variiert je nach Expression und in Abhängigkeit des exprimierten Proteins bzw. des verwendeten Vektors. Die Zellernte erfolgt durch Zentrifugation im KA-9000 Rotor bei 4 °C und 6000 Upm für 10 min. Die Zellpellets werden in 1/100 Kulturvolumen Wasser resuspendiert, aliquotiert, erneut pelletiert und bei -70 °C eingefroren und gelagert.

### *Zellaufschluß*

Das gefrorene Zellpellet wird in mindestens 2,5 ml Puffer 10/400 pro g Zellen aufgetaut und resuspendiert. Dabei wird pro 50 ml Lösung eine Protease-Inhibitor-Tablette (Complete™, Boehringer Mannheim) zugegeben. Je nach zu reinigendem Protein bzw. auszuführender Chromatographie werden Tabletten mit EDTA (StrepTag- und GST-Fusionsproteine) oder ohne EDTA (6His-Fusionsproteine) verwendet. Die Zellsuspension wird in einer auf Eis vorgekühlten French-Press-Zelle aufgeschlossen. Es sind dafür 5 Durchgänge in einer 20K Zelle (1000 psi), oder 3 Durchgänge in einer 40K Zelle (1800 psi) erforderlich. Die Geschwindigkeit des Flüssigkeitsaustritts aus der Druckzelle ist über das Auslaßventil so geregelt, daß die Flüssigkeit nicht schneller als tropfend austritt. Der Zellaufschlußgrad wird jeweils mit dem Durchlichtmikroskop (Zeiss) überprüft, er liegt meistens zwischen 70 % und 90 %.

**Herstellung von klaren Zellysaten (Überständen)**

Das Zellysatz wird durch Zentrifugation für 30 min bei 4 °C, 20000 Upm (SS34 Rotor) und anschließender Zentrifugation für 60 min bei 4 °C, 35000 Upm im Ti70 Rotor von den unlöslichen Bestandteilen getrennt. Kleine Partikel und Schwebestoffe werden anschließend durch Filtration durch eine 0,45 µm Filtrationseinheit aus der Lösung entfernt. Zur Reextraktion der unlöslichen Zellbestandteile wird das Pellet in einem halben Volumen Zellaufschlußpuffer resuspendiert und 5 mal 1 min auf Eis mit dem Ultraschallstab behandelt. Diese Suspension wird ebenso wie zuvor das Zellysatz durch Zentrifugation und Filtration von unlöslichen Bestandteilen getrennt.

**2.6.1. Zellaufschluß von *S. cerevisiae* mit Glasperlen nach Sphäroplastierung**

Die Zellen einer 5 ml Übernachtskultur werden in der Megafuge bei 4 °C, 6000 Upm für 5 min zentrifugiert, mit 1 ml SCE-Puffer gewaschen und in 500 µl SCE-Puffer mit 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol und 100 µg/ml Zymolyase aufgenommen. Das Gemisch wird bei 37 °C für 15 bis 60 min inkubiert und die Bildung von Sphäroplasten dabei regelmäßig unter dem Durchlichtmikroskop (Zeiss) überprüft. Der Sphäroplastensuspension wird ein Protease-Inhibitor-Cocktail (2.3.1.) und ein halbes Volumen Glasperlen (säuregewaschen, Durchmesser 0,425–0,600 mm, Sigma) zugefügt. Das Gemisch wird mindestens 15 min bei RT bewegt (Eppendorf-Mixer 5432), und das Zellysatz anschließend wie unter 2.6. beschrieben behandelt.

**2.6.2. Herstellen von TCA-Gesamtzellextrakten aus *S. cerevisiae* für analytische Zwecke**

2 ml einer Übernachtskultur (OD<sub>600</sub> zwischen 1 und 2) werden in der Mikrozentrifuge bei RT für 1 min mit 13.000 Upm zentrifugiert und die Zellen in 500 µl 5 % (w/v) Trichloressigsäure resuspendiert. Der Suspension wird ein halbes Volumen Glasperlen (säuregewaschen, Durchmesser 0,425 –0,600 mm, Sigma) zugefügt und das Gemisch mindestens 15 min bei RT geschüttelt (Eppendorf-Mixer 5432). Das Lysatz wird abgenommen und die Glasperlen mit 250 µl 5 % (w/v) Trichloressigsäure gewaschen. Die vereinigten Lysate werden für 15 min auf Eis inkubiert. Die ausgefällten Proteine werden in der Mikrozentrifuge 10 min mit 13.000 Upm sedimentiert, mit 500 µl eiskaltem (-20 °C) Azeton gewaschen und in 10 µl 3 M Tris, pH 8,8 und 100 µl Harnstoffprobenpuffer resuspendiert. Nach 5-minütiger

Inkubation bei 95 °C werden unlösliche Bestandteile 5 min in der Mikrozentrifuge mit 13.000 Upm abzentrifugiert.

## 2.7. Arbeiten mit DNA

### 2.7.1. Standardmethoden

Sämtliche Standardmethoden, die im Folgenden nicht beschrieben sind, wie Inkubation von DNA mit Restriktionsenzymen und DNA-Ligationen werden nach Maniatis et al., (1982) oder nach den Angaben des Herstellers der verwendeten Enzyme oder Materialien durchgeführt.

Für folgende Arbeiten wurden Materialien der Firmen Qiagen oder BioRad nach Herstellerangaben verwendet:

Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i> ( $\leq 20 \mu\text{g}$ DNA):	QIAprep Spin Miniprep Kit
	Quantum Prep, Plasmid Miniprep Kit; BioRad
Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i> ( $\leq 100 \mu\text{g}$ DNA):	Qiagen Plasmid Midi Kit
Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen:	QIAEX II Gel Extraction Kit
Reinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen:	QIAquick Nukleotide Removal Kit
	QIAquick PCR Purification Kit

### 2.7.2. Plasmide

Die in dieser Arbeit für Klonierung und Expression verwendeten Plasmide sind im folgenden aufgeführt. Die zugehörigen Vektorkarten sind (mit Ausnahme von pBC-Arrestin) im Anhang dargestellt.

<u>Plasmid:</u>	<u>Marker:</u>	<u>Herkunft/Referenz:</u>
pCR Script SK <sup>+</sup>	Amp <sup>r</sup>	Stratagene, Amsterdam, Holland
pUC18	Amp <sup>r</sup>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pCR-BLUNT	Kan <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup>	Invitrogen, Groningen, Holland
pGEX-4T-1	Amp <sup>r</sup>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pASK75	Tet <sup>r</sup> , Amp <sup>r</sup>	Biometra, Göttingen
pQE-30	Amp <sup>r</sup>	Qiagen, Hilden
pBC-Arrestin	Amp <sup>r</sup>	Lohse M., Würzburg
pYEX-BX	Amp <sup>r</sup> , leu2d, ura3	Clontech, Heidelberg
pEG-KT	Amp <sup>r</sup> , leu2d, ura3	Mitchell et al., 1993

### 2.7.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt im GeneQuant-Photometer (Pharmacia) nach Anleitung des Herstellers.

### 2.7.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR wird zur *in vitro* Vervielfältigung von DNA-Fragmenten verwendet. Man benötigt dazu zwei Primer, von denen der eine zum 3'-Bereich der gewünschten Sequenz und der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereichs komplementär ist. Dabei ist es zum einen möglich, am 5'-Ende der Primer nicht komplementäre Sequenzen anzuhängen, was z.B. das Einführen neuer Restriktionsschnittstellen an den Enden der amplifizierten DNA ermöglicht. Zum anderen können einige Nukleotide im mittleren Bereich des Primers ebenfalls nicht komplementär sein, was den Austausch einzelner Basen ermöglicht (ortsspezifische Mutagenese).

#### 2.7.4.1. Reaktionsbedingungen

Für die PCR - Amplifizierung wird ein Enzymgemisch aus den thermostabilen Enzymen Taq-DNA-Polymerase und Pwo-DNA-Polymerase (Expand High Fidelity PCR System, Boehringer Mannheim) beziehungsweise Pfu-DNA-Polymerase (TaqPlus Precision PCR System, Stratagene) verwendet. Dabei dient hauptsächlich die Taq-DNA-Polymerase der Amplifizierung, die Pwo- und die Pfu-DNA-Polymerase haben vornehmlich Korrekturfunktion. Es wird der jeweils mitgelieferte Reaktionspuffer verwendet.

Die Reaktionsansätze ohne Enzyme werden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen auf Eis zusammengegeben und für 3-4 min auf 95 °C erhitzt. Das Enzymgemisch wird zugegeben, und die Reaktion im Thermocycler durchgeführt.

#### Reaktionsansatz:

Primer 1 (100 pmol/µl)	1,0 µl
Primer 2 (100 pmol/µl)	1,0 µl
Template (Plasmid)	20,0 ng
dNTP Mix (je 5 mM)	5,0 µl
10 x Reaktionspuffer	10,0 µl
Enzymgemisch	1,0 µl
H <sub>2</sub> O	ad 100,0 µl

*Reaktionsbedingungen:*

Schritt 1: 1 min 95 °C

Schritt 2: 1 min Annealing-Temperatur ( $T_m - 4$  °C)

Schritt 3: 1 min 72 °C

Schritt 4: gehe zu Schritt 2, 29 x

Schritt 5: bis zur manuellen Beendigung des Programms 4 °C

$$T_m = (\text{Anzahl Basenpaare A:T zwischen Template und Primer}) \times 2 \\ + (\text{Anzahl Basenpaare G:C zwischen Template und Primer}) \times 4$$

**2.7.4.2. Reinigung von PCR- amplifizierten DNA-Fragmenten**

Zur Reinigung der PCR-Produkte wird das Reaktionsgemisch in Agarosegelen (2.7.8.) aufgetrennt, und die Produktbande aus dem Gel ausgeschnitten. Die weitere Aufreinigung erfolgt mit dem QIAEX Gel Extraction Kit.

**2.7.4.3. Klonierung von PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten**

Gereinigte PCR-Produkte werden nach Herstellerangaben mit einem der unten aufgeführten Kits in die entsprechenden Vektoren zwischentklont.

Sure Clone Ligation Kit (Pharmacia) in die SmaI-Schnittstelle von pUC18

PCR-Script (Stratagene) in die SrfI-Schnittstelle von pCR-Script Amp SK(+)

Zero Blunt PCR Cloning Kit (Invitrogen) in die StuI-Schnittstelle von pCR-Blunt

**2.7.5. DNA-Sequenzierung (Cycle Sequencing)**

Das Cycle Sequencing beruht wie die PCR auf wiederholten Zyklen von Denaturierung, Primer Anheftung und Elongation. Je nach Länge des zu sequenzierenden DNA- Bereichs wurde eins der im folgenden aufgeführten Systeme verwendet.

### 2.7.5.1. Kleine DNA-Fragmente, GATC-System

Das GATC-System verwendet die Direkt Blotting Elektrophorese (Beck & Pohl, 1984). Dabei wird während des Gellaufs eine Transfermembran in engem Kontakt zur Gelunterkante unter dem Gel entlangefahren, wodurch es zum Transfer der DNA-Banden auf die Membran kommt.

DNA-Fragmente bis zu einer Länge von 400 bp können mit diesem GATC-System sequenziert werden. Das Cycle Sequencing wird mit Thermo Sequenase (Amersham) und dem GATC-BioCycle Sequencing Kit durchgeführt. Dabei erfolgt die Markierung durch Einbau von Biotin-markierten Dideoxy-Nukleotiden. Über diese Biotin-Markierung erfolgt die Detektion der DNA-Stränge. Gelelektrophorese und Blotting erfolgen mit dem GATC-1500-System, DNA-Sequencer. Es wird wie vom Hersteller angegeben verfahren. 2 µg Plasmid-DNA werden pro Extensions-Mix (20 µl Gesamtvolumen) in zehnfach verdünntem TE eingesetzt. Die DNA wird gegebenenfalls wie unter 2.7.9. beschrieben mit Pellet Paint konzentriert. Die Sequenzreaktionen wird in 0,2 ml Gefäßen angesetzt, mit Paraffinöl überschichtet und im Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert:

Denaturierung:	3 Minuten 95 °C
30 Zyklen:	30 Sekunden 50 °C
	30 Sekunden 95 °C
Final:	4 Minuten 60 °C

2 µl von jeder Reaktion (6 µl Gesamtvolumen) werden auf das Gel (4 %iges Acrylamidgel, 32 cm lang) aufgetragen.

Zur Fixierung der DNA auf der Blottingmembran wird diese getrocknet und mit UV-Licht bestrahlt (1,6 Joule). Die kolorimetrische Detektion erfolgt im GATC-Tube nach Herstellerangaben.

### 2.7.5.2. Große DNA-Fragmente, LI-COR-System

DNA-Fragmente welche größer als 400 bp sind, werden mit dem LI-COR-System sequenziert. Das Long Read-Verfahren ermöglicht es Fragmente von teilweise über 1200 bp zu lesen.

Durchgeführt wird das Cycle Sequencing mit dem Amersham Thermosequenase Kit. Dabei erfolgt die Markierung durch Verwendung von IRD800-gekoppelten Oligonukleotiden. Über die Fluoreszenzmarkierung erfolgt die Detektion der DNA-Stränge. Gelelektrophorese und Detektion werden mit dem LI-COR 4200 Gene ReadIR durchgeführt. Die Reaktionen werden nach Herstellerangaben angesetzt und mit Chill-Out-Wax (Biozym) überschichtet. 5,7 µl Plasmid in Trispuffer (100 ng-150 ng DNA pro 1000 Nukleotide) wurden pro



Template/Primer-Premix (7 µl Gesamtvolumen) eingesetzt. Die Sequenzreaktionen wurden in 0,2 ml Gefäßen im Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert:

Denaturierung: 2 Minuten 94 °C  
 30 Zyklen: 40 Sekunden 94 °C  
               40 Sekunden 50 °C  
               60 Sekunden 70 °C  
 Bis zur manuellen Beendigung 4 °C

Nach Zugabe von 3 µl Stoppuffer (Amersham) wird erneut für 2 min bei 70 °C denaturiert. Die Proben werden bis zum Probenauftrag unter Lichtabschluß bei 4 °C gelagert. 1,5 µl von jeder Reaktion (6 µl Gesamtvolumen) werden auf das Gel (4,6 %iges Acrylamidgel, 66 cm lang) aufgetragen. Die Detektion erfolgt zeitgleich mit der Elektrophorese mittels eines Infrarotlasers bei 800 nm. Es wird mit der Software Base ImageIR 4.0 ausgewertet.

## 2.7.6. Oligonukleotide (Primer)

Die Oligonukleotide werden von Eurogentec (Seraing, Belgien), MWG (Ebersberg) oder Gibco/BRL (Konstanz) bezogen. Zur Arrestinsequenz nicht-komplementäre Bereiche sind im Zeichenformat „fett“ hervorgehoben, sie bezeichnen Nukleotidaustausch, Anhängen von Sequenzen für Affinitätspeptide oder Einführung der Sequenzen von Restriktionsschnittstellen. Komplementäre Bereiche zu Vektoren sind unterstrichen.

### 2.7.6.1. PCR-Primer

Als PCR-Primer werden hier Oligonukleotide bezeichnet, welche die codierende Arrestinsequenz nicht verändern und lediglich zur Modifikation der Randbereiche dienen. Mit diesen Primern werden Restriktionsschnittstellen hinzugefügt, Protease-Schnittstellen eingefügt oder Affinitätspeptide angehängt.

#1	Arr-GST X	5' <u>CCG</u> <b>CTC GAG</b> TCA CTC ATC CAT AGC CGC 3'
#2	Arr-GST B	5' CGC <b>GGA TCC</b> ATG AAG GCC AAT AAG CCC 3'
#3	Arr-Str-X-2	5' <u>GCT CTA GAT</u> AAC GAG GGC AAA <u>AAA</u> TGA AGG CCA ATA AGC CCG 3'
#4	Arr-Str-Eco47-2	5' <u>CAA GCG CTC</u> TCA TCC ATA GCC GCC TCC 3'
#5	Arr-Str-Eag/B	5' <b>CGG CCG</b> CAA AGG CAA ATA AGC CCG CAC C 3'

#6	His-C-Arr	5' <u>CGG AAT TCT</u> CAA TGG TGA TGG TGA TGG TGC TCA TCC ATA GCC GCC TCC TG 3'
#7	Strep-C-Arr	5' <u>CGG AAT TCT</u> CAT TTT TCG AAC TGC GGG TGG CTC CAG CTA GCC TCA TCC ATA GCC GCC TCC TG 3'
#8	Eco-C-Arr	5' <u>CGG AAT TCT</u> CAC TCA TCC ATA GCC GCC TCC TG 3'
#9	p44-C-Eco	5' <u>CGG AAT TCT</u> CAT GCA CTT TCC TTG GCG GTA TCT GG 3'
#10	Strep-N-Arr	5' <u>CGG AAT TCA</u> TGG CTA GCT GGA GCC ACC CGC AGT TCG AAA AAA AGG CCA ATA AGC CCG CAC C 3'
#11	His-N-Arr	5' <u>CGG AAT TCA</u> TGC ACC ATC ACC ATC ACC ATA AGG CCA ATA AGC CCG CAC C 3'
#12	Eco-N-Arr	5' <u>CGG AAT TCA</u> TGA AGG CCA ATA AGC CCG CAC C 3'
#13	His-Xa-N-Arr	5' <u>CGG AAT TCA</u> TGC ACC ATC ACC ATC ACC ATA TCG AAG GTC GTA AGG CCA ATA AGC CCG CAC C 3'
#14	N-GST-Thr-Arr	5' <u>CTG GTT CCG CGT GGA TCC</u> ATG TCC CCT ATA CTA GGT TAT TG 3'
#15	N-Xho-Arr	5' GGT TCT CTA CTC GAG TGA TTG 3'
#16	C-Eco-GST	5' <u>GGA ATT CTC ATC AAT CCG ATT TTG GAG GAT GGT</u> C 3'
#17	C-Arr-Thr-GST	5' <u>GGA TCC ACG CGG AAC CAG</u> CTC ATC CAT AGC CGC CTC C 3'

### 2.7.6.2. Sequenzierungsprimer

Als Sequenzierungsprimer werden hier Oligonukleotide bezeichnet, die für die Sequenzierung von DNA verwendet wurden. Je nach verwendeter Sequenziermethode sind die Oligonukleotide mit dem Farbstoff IRD800 gekoppelt.

#1	pASK-Forward	5' AGA CAG CTA TCG CGA TTG CA 3'
#2	pASK-Backward	5' CGC AGT AGC GGT AAA CG 3'
#3	Seq Universal	5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'
#4	Seq Reverse 1	5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'
#5	Arr-Rev-BsmII	5' GCG CGT GCT GTA CCT TC 3'
#6	Arr-Rev-Bsm	5' GTG GAA GAG GAC AAA ATT C 3'
#7	IRD-pYEX-BX-fwd	5' CAT ATA GAA GTC ATC GA 3'
#8	IRD-pYEX-BX-rev	5' TTT GCA GCT ACC ACA TT 3'
#9	IRD800-revers	5' GGA AAC AGC TAT GAC CAT G 3'
#10	IRD800-M13-20	5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'

- ### 2.7.6.3. Mutageneseprimer

### 2.7.7. Mutagenese des Arrestingens

**B.:** Falls die zu mutierende Stelle relativ nah am Anfang oder am Ende des Arrestingens liegt, erfolgt zunächst eine PCR mit einem Mutagenese- und einem PCR-Primer. Das gereinigte PCR-Produkt wird anschließend in einer Folge-PCR als Primer eingesetzt, als Gegenprimer wird der entsprechende PCR-Primer des anderen Gen-Endes verwendet. Die Annealing-Temperatur richtet sich dabei nach dem Gegenprimer.

**C.:** Falls die zu mutierende Stelle mittig im Arrestingen liegt, oder in Fällen, in denen die unter B. beschriebene Strategie fehlschlägt, wird folgendes Vorgehen angewendet: Der Mutageneseprimer wird in doppelter Ausfertigung, d.h. komplementär zu beiden DNA-Strängen erstellt, und zwar in der Weise, daß sich aus dem komplementären Bereich eine optimale Annealing-Temperatur ergibt. Es werden dann zwei parallele PCR-Reaktionen angesetzt, die eine mit dem 5'-PCR-Primer und dem entsprechenden ersten Mutageneseprimer, die andere mit dem 3'-PCR-Primer und dem entsprechenden zweiten Mutageneseprimer. Die Produkte beider Reaktionen werden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und als Template in einer abschließenden PCR eingesetzt. Dabei genügt die Zugabe winziger Agarosestücke (die PCR-Produkte enthalten) zum Reaktionsansatz. Als Primer werden die entsprechenden, zuvor eingesetzten PCR-Primer verwendet.

### **2.7.8. Agarosegelelektrophorese**

Die Agarose wird in TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und mit 7,5 µl einer 10 mg/ml Ethidiumbromidlösung pro 100 ml Agaroselösung versetzt. Die Agaroselösung kann mehrere Tage bei 60 °C aufbewahrt werden.

### **2.7.9. Konzentrieren von DNA mit Pellet Paint**

Zum Konzentrieren wird die DNA mit Isopropanol oder Ethanol unter Verwendung von Pellet Paint (Novagen) gefällt. Der rote Glycofarbstoff, der mit der DNA assoziiert, macht die DNA-Pellets sichtbar und verfestigt sie. Die Fällung erfolgt nach Herstellerangaben, die DNA wird anschließend in Wasser oder Puffer (10 mM oder 1 mM Tris/HCl, pH 8,5) resuspendiert.

### **2.7.10. Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA**

Für die Transformation von *E. coli* werden kompetente Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode, einem modifizierten Protokoll nach Hanahan (frozen storage III) (1983, 1985) hergestellt. Zur Transformation werden jeweils 10 ng-200 ng Plasmid-DNA im Ligationsansatz bzw. 1 ng reines Plasmid verwendet.

### 2.7.11. Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNA

Es wird eine modifizierte Lithiumacetat-Methode nach Schiestl & Gietz (1989) durchgeführt. 100 ml einer Kultur in YPD werden bei 30 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 bis 0,7 angezogen. Die Zellen werden dreimal mit 50 ml und zweimal mit 1 ml sterilem Wasser, anschließend zweimal mit 1 ml TE-LiAc Lösung gewaschen. Sie werden in 1 ml TE-LiAc aufgenommen. Zur Transformation werden jeweils 50 µl der transformationskompetenten Zellen mit 300 µl TE-LiAc-PEG-Lösung versetzt und nach Zugabe von etwa 1 µg Plasmid-DNA unter leichtem Schütteln 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach 20-minütiger Inkubation bei 42 °C werden die Zellen sedimentiert, zweimal mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen und in 500 µl sterilem Wasser resuspendiert. 200 µl und 300 µl der Zellen werden auf SC-Agarplatten mit Glukose und ohne Uracil bei 30 °C bis zum Erscheinen von Kolonien inkubiert.

## 2.8. Arbeiten mit Proteinen

### 2.8.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgt mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) in vertikalen Gelapparaturen (2.1.). Für das Trenngel wird eine Acrylamidkonzentration von 12 % (w/v) bzw. 15 % (w/v) und für das Sammelgel von 3,8 % (w/v) eingesetzt. Sammel- und Trenngel werden entsprechend der im folgenden aufgeführten Angaben angesetzt und die Polymerisation jeweils durch Zusatz von 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat in Wasser gestartet. Die Proteinproben werden, je nach zu ladendem Volumen, mit entsprechender Menge 2-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer bzw. 5-fach konzentriertem Harnstoffprobenpuffer versetzt. Pellets werden in 1-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer aufgenommen. Unmittelbar vor dem Laden des Gels werden die Proben 5 min bei 95 °C denaturiert.

#### Trenngel:

12/15,0 % (w/v) Acrylamid  
0,4 % (w/v) Bisacrylamid  
0,1 % (v/v) TEMED  
in Trenngelpuffer

#### Sammelgel:

3,8 % (w/v) Acrylamid  
0,1 % (w/v) Bisacrylamid  
0,1 % (v/v) TEMED  
in Sammelgelpuffer

Die elektrophoretische Trennung erfolgt bei konstanter Spannung (je nach Gelgröße und Herstellerangaben), bis das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau das Ende des Trenngels erreicht. Anschließend wird das Gel gefärbt oder die Proteine im Westernblotverfahren auf Membranen transferiert (2.8.3.).

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließendem Westernblotting für N-terminale Sequenzierung wird nach Schägger & von Jagow, (1987) wie beschrieben durchgeführt. Dabei wird der Geltyp 10 % T, 3 % C eingesetzt (T=Konzentration von Acrylamid und Bisacrylamid, C=Anteil von Bisacrylamid von T). Vor dem Probenauftrag findet ein Vorlauf des Gels (ohne Proben) von 5 min statt.

## **2.8.2. Färben von Proteinbanden in SDS-Polyacrylamid-Gelen**

Zur Färbung von Proteinbanden in SDS-Gelen wurden in dieser Arbeit folgende Methoden angewandt: Coomassie- (Serva), Sypro-Orange- (BioRad) oder Silberfärbung (Roti-Black, Roth) .

### **2.8.2.1. Silberfärbung mit Roti-Black**

Die Färbung wird entsprechend den Herstellerangaben (Roth) durchgeführt.

### **2.8.2.2. Färben mit Coomassie-Färbelösung**

Das Gel wird für 5 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Nicht gebundener Farbstoff wird mit 10 % (v/v) Essigsäure ausgewaschen.

### **2.8.2.3. Coomassie-Färbung mit GelCode**

Das Gel wird 3 mal für 10 min in 100 ml Wasser geschwenkt und anschließend mit GelCode-Lösung (7,5 ml pro Minigel) für 1 h bis 12 h inkubiert. Durch abschließende Inkubation in Wasser (mindestens 12 h) kann die Färbung intensiviert werden.

#### **2.8.2.4. Färben mit Sypro-Orange**

Das Gel wird 1 h in einer 0,02 %igen (v/v) Lösung von Sypro-Orange in Westernblot-Puffer im Dunkeln gefärbt. Dann wird kurz mit Westernblot-Puffer gewaschen. Das Visualisieren der Proteinbanden erfolgt unter UV-Licht.

### **2.8.3. Westernblotanalyse**

Zur immunochemischen Detektion von Proteinen im Westernblotverfahren (Kyhse-Anderson, 1984) werden die Proteine nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch auf Membranen übertragen. Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgt über Antikörper bzw. Konjugate (2.8.3.4.).

#### **2.8.3.1. Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran**

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamid-Gelen erfolgt im "semi-dry"-Verfahren (Transferkammer der Firma Hoelzel) auf PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore; PolyScreen, NEN). Die Membran und 6 Lagen 3MM Whatman Papier werden auf Trenngel-Größe zugeschnitten. Die PVDF-Membran wird vor dem Transfer zunächst mit Methanol benetzt und anschließend, wie auch das Whatman Papier, in Blot-Puffer getränkt. Das Trenngel äquilibriert 1 min in Blot-Puffer. Die Graphitplatten der Transferkammer werden gut mit Blot-Puffer befeuchtet und die einzelnen Lagen wie folgt luftblasenfrei geschichtet:

Kathode (- Pol)  
3 Lagen Whatman Papier  
Trenngel  
Transfermembran  
3 Lagen Whatman Papier  
Anode (+ Pol)

Der Transfer erfolgt entsprechend den Membran-Herstellerangaben in Abhängigkeit von der Blotgröße bei konstanter Stromstärke. Anschließend wird die Blotmembran zur Visualisierung der transferierten Proteine mit Ponceau S-Lösung gefärbt. Nicht gebundener Farbstoff wird mit Wasser abgewaschen. Durch mehrmaliges Waschen der Membran in TBS wird nach der Dokumentation (Fotokopierer) vollständig entfärbt.

### 2.8.3.2. Immunochemische Detektion

Die Membran wird 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit 10 % (w/v) Magermilchpulver in TBS abgesättigt. Die Inkubation mit Primärantikörper oder Konjugat in 10 % (w/v) Magermilchpulver in TBS erfolgt für 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht. Die Membran wird 2x mit TBS-T und 1x mit TBS für je 10 min bei Raumtemperatur gewaschen. Die Inkubation mit Sekundärantikörper erfolgt in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Die Membran wird wie nach Inkubation mit dem ersten Antikörper gewaschen.

Wenn das SA-AP-Konjugat gegen den StrepTag eingesetzt wird, erfolgt die Absättigung der Membran nach Herstellerangaben mit Roti-Block (Roth). Das Konjugat wird in TBS verdünnt eingesetzt. Nach Inkubation mit dem SA-AP-Konjugat wird kolorimetrisch durch Zugabe von 7,5 % (w/v) Nitrotetrazoliumblau in 70 % (v/v) Dimethylformamid und von 5 % (w/v) 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat in Dimethylformamid detektiert (Blake et al., 1984).

Zur Chemolumineszenz-Detektion über Peroxidase werden die Substrate Super Signal oder Super Signal Ultra (Pierce) nach Herstellerangaben eingesetzt. Röntgenfilme (XAR oder Biomax-ML, Kodak) werden je nach Leuchtintensität 10 sek bis über Nacht exponiert. Die Filme werden nach Herstellerangaben mit Lösungen der Firma Kodak entwickelt.

### 2.8.3.3. “Strippen“ von Westernblots

Nach Chemolumineszenz-Detektion ist anschließend ein „Strippen“ der Membran und erneute Inkubation mit Antikörpern möglich. Zum Strippen wird der Blot 2 mal 30 min bei 50 °C in Stripping-Lösung unter leichtem Schwenken inkubiert. Es wird 2 mal mit TBS-T und 1 mal mit TBS gewaschen, wie oben beschrieben abgesättigt und mit Antikörperlösungen inkubiert.



### 2.8.3.4. Verwendete Antikörper und Konjugate

Die in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie Konjugate sind in den Tabellen 2.3. bis 2.5. aufgelistet.

**Tabelle 2.3.:** Primärantikörper

Name	Antigen / Epitop	Eigenschaft	Herkunft	Verwendung
anti GST	Glutathion-S-Transferase	polyklonal, Ig aus Ziege	Pharmacia	1:1000
anti Arrestin	Arrestin	polyklonal, Ig aus Kaninchen	I. Weyand	1:1000, 1:500
F4C1	AS 42-48 aus Arrestin	monoklonal aus Maus	L. Donoso	1:1000, 1:500
A2G5	AS 360-368 aus Arrestin	monoklonal aus Maus	L. Donoso	1:1000
D9F2	AS 360-368 aus Arrestin	monoklonal aus Maus	L. Donoso	1:1000
A9C6	AS 376-386 aus Arrestin	monoklonal aus Maus	L. Donoso	1:1000
S6H8	AS 40-50 aus Arrestin	monoklonal aus Maus	J.P. Faure	1:1000
S7D6	AS 40-50 aus Arrestin	monoklonal aus Maus	J.P. Faure	1:1000
S8D8	AS 40-50 aus Arrestin	monoklonal aus Maus	J.P. Faure	1:1000
AH <sub>2</sub> F1	Arrestin	monoklonal aus Maus	J.P. Faure	1:1000

**Tabelle 2.4.:** Sekundärantikörper

Name	Antigen / Epitop	Eigenschaft	Herkunft	Verwendung
anti Ziege	IgG aus Ziege	polyklonal, Ig aus Kaninchen, Peroxidase konjugiert	Sigma	1:10000, 1:20000
anti Maus	IgG und IgM aus Maus	polyklonal, Ig aus Ziege, Peroxidase konjugiert	Pierce	1:10000, 1:20000
anti Kaninchen	IgG aus Kaninchen	polyklonal, IgG aus Ziege, Peroxidase konjugiert	Sigma	1:10000, 1:20000

**Tabelle 2.5.:** Konjugate

Name	Antigen / Epitop	Eigenschaft	Herkunft	Verwendung
SA-AP-Konjugat	StrepTag / Biotin	Streptavidin an Alkalischer Phosphatase	GATC	1:4000
Anti-poly-Histidin, Peroxidase Konjugat	poly-Histidin	monoklonal, IgG2a aus Maus, Peroxidase Konjugat	Sigma	1:5000

Nähere Angaben zu den verwendeten Primärantikörpern (Tab. 2.3.) sind zu finden in: Donoso et al., 1985; Knospe et al., 1988; Knospe et al., 1989; Gregerson et al., 1989; Donoso et al., 1990; Faure et al., 1984.

## 2.8.4. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

### 2.8.4.1. Methode nach Bradford

Es wird nach Bradford (1976) der BioRad-Microassay nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Standard für die Eichkurve wird eine BSA-Stammlösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml (Pierce) verwendet.

### 2.8.4.2. UV-VIS Spektroskopie

Die Bestimmung der UV-VIS-Absorption erfolgt mit dem UV2101PC-Photometer (Shimadzu). Proteinkonzentrationen werden über das Lambert-Beer'sche Gesetz ermittelt:

$$c = A / \epsilon d$$

$c$  = Konzentration (mol/l)  
 $\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient ( $\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )  
 $d$  = Schichtdicke der Küvette  
 $A$  = Absorption

Bei Proteingemischen wurde folgende, allgemeine Näherung zur Konzentrationsberechnung verwendet:  $A_{280} = 0,66 \cong 1 \text{ mg/ml}$

Für Arrestinproben wird zur Berechnung ein Extinktionskoeffizient von  $\epsilon_{0,1} = 0,638$  (bei 278 nm, Palczewski et al., 1992b) und ein Molekulargewicht von 45317 Da (Buczylko & Palczewski, 1993) zugrunde gelegt.

Die Ermittlung von Rhodopsinkonzentrationen erfolgt durch Absorptionsmessungen bei 500 nm. Zuvor wird das Membranprotein in 0,1 % (w/v) Emulphogen in Wasser verdünnt und solubilisiert. Die Probe wird zunächst im Dunkeln und dann nach 15 min Belichtung (Tageslicht) erneut vermessen. Die Differenz der beiden Meßwerte dient zur Berechnung des unbelichteten Rhodopsinanteils im Grundzustand. Nur dieser Anteil ist interessant, da nur diese Moleküle für Belichtungsexperimente zur Verfügung stehen. Es wird zur Berechnung ein molarer Extinktionskoeffizient von  $\epsilon = 40600 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Wald & Brown, 1953) verwendet.

### 2.8.5. Umpuffern und Konzentrieren von Proteinen

Das Umpuffern von Proteinen erfolgt nach Herstellerangaben unter Verwendung von sogenannten Entsalzungssäulen (PD-10 Säulen, Pharmacia oder Econo-Pac 10DG-Säulen, BioRad). Anschließend wird die Proteinlösung unter Verwendung von Ultrafiltrationseinheiten (2.2.) konzentriert. Die Auswahl der Ultrafiltrationseinheit erfolgt nach dem Volumen der zu konzentrierenden Proteinlösung und nach der Größe des Proteins. Die Ultrafiltration wird bei 4 °C oder 10 °C nach Herstellerangaben durchgeführt. Durch wiederholtes Konzentrieren und Verdünnen mit einer anderen Lösung ist auch bei der Ultrafiltration ein Umpuffern von Proteinen möglich.

## 2.9. Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht auf dem folgenden Prinzip:

Ein biospezifischer Ligand ist kovalent an das Chromatographiematerial – die Matrix – gebunden. Das zu reinigende Protein besitzt entweder natürlich (aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften) oder über gentechnisch fusionierte, sogenannte “Tags“ oder Affinitätspeptide, eine starke Affinität zum immobilisierten Liganden. Unspezifisch an die Matrix gebundene Proteine können durch Waschen entfernt werden, die Elution erfolgt durch Konkurrenz mit dem freien Liganden.

### *Durchführung*

Das hier beschriebene allgemeine Verfahren wird für alle rekombinanten Fusionsproteine von Arrestin verwendet. Die jeweils eingesetzten Säulenmaterialien, Puffer und entsprechenden Volumina sind in der Tabelle 2.6.. aufgelistet.

**Tabelle 2.6.:** Zusammenstellung der verschiedenen affinitätschromatographischen Reinigungsverfahren

Protein	Expressions-organismus	Zellaufschluß puffer	Waschpuffer 1 / Volumen	Waschpuffer 2 / Volumen	Elutionspuffer / Volumen	Eluate- Fraktions- volumen	Regenera- tionspuffer / Volumen	Säulenmaterial / Volumen
GST-Arrestin  bzw. Arrestin-GST	<i>E. coli</i>  <i>S. cerevisiae</i>	Arrestin-Puffer oder PBS oder Wasser  Puffer 10/400	Arrestin-Puffer oder PBS oder Wasser, 700 ml  Puffer 10/400, 200 ml	  Puffer 10/800, 500 ml	-30 mM Glutathion in Arrestin-Puffer oder PBS oder Wasser, 50 ml -30 mM Glutathion in Puffer 10/800, 50 ml	10 ml       10 ml	6 M GuCl, 100 ml       100 ml	Glutathion-Sepharose 4B, 20 ml
MRGS-6His- Arrestin  bzw. Arrestin.6His	<i>E. coli</i>  <i>S. cerevisiae</i>	His-Bindungspuffer  Puffer 10/400	His-Bindungspuffer, 200 ml  Puffer 10/400, 200 ml	His-Waschpuffer, 700 ml  His-Waschpuffer, 700 ml	-¼ His-Elutionspuffer, 50 ml -His-Elutionspuffer, 15 ml	10 ml 15 ml	His-Strippuffer, 100 ml 6 M GuCl, 100 ml	Chelating Sepharose Fast Flow, 20 ml, geladen mit 50 mM NiSO <sub>4</sub>
Arrestin- StrepTagI	<i>E. coli</i>	Puffer W	Waschpuffer W, 20 ml		Elutionspuffer E, 3 ml	0,5 ml	6M GuCl, 5 ml	Streptavidin- Sepharose, 0,5 ml
Arrestin- StrepTagII	<i>S. cerevisiae</i>	Puffer 10/400	Puffer 10/400, 200 ml	Puffer 10/800, 500 ml	Strep-Elutionspuffer, 20 ml	0,5 ml	Strep-Regenera- tionspuffer, 10 ml 6 M GuCl, 10 ml	StrepTactin- Sepharose, 4 ml

Die Reinigung erfolgt bei RT unter Schwerkraftfluß, als Säulenkörper wurden Econo-Säulen (BioRad) verwendet. Vor dem Probenauftrag werden die Affinitätssäulen mit 5 Säulenvolumen Zellaufschlußpuffer äquilibriert.

Erster und zweiter Überstand (2.5., 2.6.) werden auf Eis gekühlt und nacheinander mit einer Flußrate von etwa 0,5 bis 1 ml/min auf die Säule aufgegeben. Bei Reinigung von Arrestin-StrepTagII werden die Überstände zuvor 1 h bei 4 °C mit 15 µg/ml Avidin inkubiert. Unspezifisch gebundene Proteine werden durch Waschen der Säule bei jeweils maximal möglicher Flußrate entfernt. Die Elution des gebundenen Fusionsproteins erfolgt bei 0,5 ml/min mit Elutionspuffer. Eluatfraktionen sowie alle übrigen Fraktionen wie Überstände, Säulendurchlauf der Probenaufgabe und Säulendurchlauf der Waschschrte wurden mittels SDS-PAGE (2.8.1.) (und/oder Westernblot, 2.8.3.) analysiert. Die Elutionseffizienz wurde durch Analyse einer Matrixprobe aus der Säule ebenfalls mittels SDS-PAGE überprüft.

Proteinhaltige Eluate wurden sofort mit Entsalzungssäulen zur Entfernung von Glutathion bzw. Desthiobiotin bzw. Diaminobiotin bzw. Imidazol umgepuffert (2.8.5.) und anschließend konzentriert. Das Umpuffern erfolgt für anschließende Kristallisation in den Puffer 10/800, oder zur Verwendung in Zentrifugations-Bindungs-Assay in den Puffer 10/100.

#### *Regeneration und Lagerung von Säulen*

Das Säulenmaterial wird nach jeder Verwendung mit den in der Tabelle 2.6. angegebenen Puffern regeneriert, mit Wasser äquilibriert und in 20 % Ethanol gelagert.

#### *Affinitätschromatographie an Immobilisierten Metallionen (Immobilised Metal Affinity Chromatography, IMAC )*

Im Unterschied zur klassischen Affinitätschromatographie ersetzt bei dem IMAC-Verfahren ein Chelatkomplex den biologischen Liganden. Die Bindung des zu reinigenden Proteins an das immobilisierte Metallion erfolgt über dessen freie Valenzen. Das Komplex-gebundene Metallion seinerseits wird über einen hydrophilen Spacer kovalent an der Oberfläche der chromatographischen Matrix fixiert. Vor allem Histidin-haltige Moleküle zeigen eine spezifische Affinität für derart immobilisierte Metallionen. Diese Eigenschaft wird bei der Herstellung rekombinanter Moleküle ausgenutzt. Auf diese Weise können selbst solche Moleküle, die keine natürliche Affinität zu Metallionen besitzen, schnell isoliert werden.

### **2.9.1. Spaltung von GST-Fusionsproteinen durch die Protease Thrombin**

**A.:** Die proteinhaltigen Eluate werden vereinigt, mit der Protease Thrombin versetzt und inkubiert. Anschließend wird zur Entfernung des freien Liganden Glutathion das Gemisch in Elutionspuffer ohne Glutathion (Tab. 2.6.) umgepuffert, und erneut auf eine Glutathion-Sepharose Säule geladen. Es wird mit einem Säulenvolumen des gleichen Puffers gespült. Der Säulendurchlauf enthält das Arrestin und wird gegebenenfalls erneut umgepuffert und anschließend konzentriert (2.8.5.).

**B.:** Das Fusionsprotein GST-Arrestin wird an die Affinitätssäule gebunden und dort mit Thrombin inkubiert. Nach erfolgreicher GST-Abspaltung hat das Arrestin keine Affinität mehr zum Glutathion des Säulenmaterials und kann durch Spülen der Säule mit Puffer (siehe A) eluiert werden. Ungeschnittenes Fusionsprotein und GST bleiben an das Säulenmaterial gebunden. Das abgespaltene Arrestin befindet sich im Durchfluß und wird umgepuffert und anschließend konzentriert.

Thrombinmenge, Temperatur und Inkubationsdauer sind bei den Experimenten unterschiedlich und werden jeweils angegeben.

### **2.9.2. Anionenaustausch-Chromatographie mittels FPLC**

Die Methode der Anionenaustausch-Chromatographie an einer Mono-Q-Säule wird zur Trennung von GST und Arrestin nach der Spaltung von GST-Arrestin Fusionsprotein aus *E. coli* verwendet. Die Chromatographie wird wie von I. Weyand (Dissertation, 1988) beschrieben unter Benutzung einer FPLC-Anlage von Pharmacia bei RT durchgeführt.

## **2.10. Präparation von Proteinen aus Rinderaugen**

### **2.10.1. Präparation von Stäbchenaußensegmenten (ROS)**

Die ROS Präparation aus dem Rinderauge wird, wie von Wilden & Kühn (1982) beschrieben, folgendermaßen durchgeführt:

Für Saccharose-Gradienten werden 17 ml Saccharoselösung mit einer Dichte von  $\rho = 1,145 \text{ g/ml}$  in Zentrifugenröhrchen eingefüllt und mit 18 ml Saccharoselösung einer

Dichte von  $\rho = 1,125 \text{ g/ml}$  überschichtet. Die Gradienten werden bis zur Verwendung bei  $0^\circ\text{C}$  gelagert. Die folgenden Arbeitsschritte erfolgen bei Rotlicht!

Frisch isolierte Retinae (meist etwa 100-300 Stück, isoliert von Frau A. Cousin) werden in 0,8 ml bis 1 ml 48 % Saccharose-Puffer pro Retina gesammelt und 1,5 min kräftig geschüttelt. Dabei brechen die Stäbchenaußensegmente am Cilium von den Innensegmenten ab. Der entstandene Retinabrei wird auf 40 ml – Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und 5 min bei  $4^\circ\text{C}$  mit 7000 Upm (Rotor JA20) zentrifugiert. Der Überstand wird durch einen Mullfingerling filtriert und anschließend mit dem gleichen Volumen 0,3 M KCl-Puffer versetzt. Es folgt eine Zentrifugation bei  $4^\circ\text{C}$  für 7 min und mit 5000 Upm (Rotor JA20). Der Überstand wird sofort und schnell abgegossen. Jedes Pellet wird mit 1,5 ml Saccharoselösung ( $\rho = 1,10 \text{ g/ml}$ ) versetzt und zunächst durch vorsichtiges Schütteln gelöst, evtl. wird ein Glasstab zu Hilfe genommen. Die Suspension wird einige Male vorsichtig mit Hilfe einer Spritze oder Pipette homogenisiert. Um die Stäbchenaußensegmente von Verunreinigungen zu trennen, werden die suspendierten, vereinigten Pellets vorsichtig auf die Saccharose-Gradienten aufgetragen. Es folgte eine Zentrifugation von 1h bei  $4^\circ\text{C}$  mit 13000 Upm (Rotor JS-13). Die Stäbchenaußensegmente reichern sich im Übergang von der mittleren in die obere Grenzschicht an und werden vorsichtig durch Aspiration gesammelt. 1 ml dieser Lösung wird für eine Rhodopsin-Bestimmung abgenommen, das Gesamtvolumen wird für die Bestimmung der Ausbeute dokumentiert.  $\frac{1}{4}$  des Volumens 0,3 M KCl Puffer wird hinzugefügt, das Gemisch auf Zentrifugenröhrchen verteilt und die ROS durch Zentrifugation bei  $4^\circ\text{C}$  für 15 min mit 15000 Upm (Rotor JA20) pelletiert. Der Überstand wird verworfen. Die Zentrifugenröhrchen mit den ROS-Pellets werden zwecks Lichtabschluß doppelt mit Alufolie eingewickelt und bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.10.2. Herstellung gewaschener, nativer ROS-Membranen (W-ROS)**

Alle Arbeitsschritte werden bei Rotlicht durchgeführt. Ein ROS-Pellet wird aufgetaut und in 1 ml 10 mM HEPES pH 7,5 pro mg Rhodopsin aufgenommen, d.h. 1 ml Puffer auf die Menge ROS, die 1 mg Rhodopsin entspricht. Die Membranen werden durch Zentrifugation bei  $4^\circ\text{C}$  für 1 h bei 35000 Upm in der Ultrazentrifuge pelletiert. Dies wird noch 3 mal wiederholt. Die Membranen werden in einem, die Zielkonzentration einstellenden, Volumen von 10 mM HEPES, 120 mM KCl, pH 7,2 resuspendiert und in schwarze Eppendorfgefäße aliquotiert. Die Eppendorfgefäße werden abschließend noch mit Aluminiumfolie umwickelt. Die W-ROS werden bei  $-70^\circ\text{C}$  eingefroren und gelagert.

### 2.10.3. *In vitro* Phosphorylierung von nativen ROS-Membranen (PMBs)

Diese Methode ist ein modifiziertes Protokoll nach Wilden (1995). Der erreichte durchschnittliche Phosphorylierungsgrad der so hergestellten PMBs liegt erfahrungsgemäß bei 5-6 Phosphatresten pro Rhodopsinmolekül (U. Wilden, pers. Mitteilung).

Es wird bei Rotlicht gearbeitet. Ein ROS-Pellet wird in etwa 1/3 Volumen pro mg Pellet Puffer 1 in einem Glas/Teflon Homogenisator resuspendiert. Es folgt eine Zentrifugation im SS34-Rotor bei 4 °C und 20000 Upm für 20 min. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und auf Eis gelagert. Das Pellet wird nun zweimal mit 1 ml pro mg Pellet Puffer 2 gewaschen, die Zentrifugation erfolgt im SS34-Rotor bei 4 °C und 20000 Upm für 40 min. Zur Gewinnung von G-Protein und PDE (Transducin und Phosphodiesterase) kann das Pellet mit 1/5 des vorherigen Volumens Puffer 3 extrahiert werden, die Zentrifugation erfolgt wie beschrieben. Der hier anfallende Überstand enthält G-Protein und PDE und kann mehrere Monate bei -70 °C gelagert werden. Das gewaschene und extrahierte ROS-Pellet wird jetzt mit dem Überstand des ersten Schrittes (enthält die Rhodopsinkinase) zusammengegeben. Es folgt eine Konzentrationsbestimmung von Rhodopsins, wozu 100 µl entnommen werden. Puffer 1 wird der Mischung hinzugefügt, ebenso 200 mM ATP, so daß Endkonzentrationen von 1 mg/ml ROS und 3 mM ATP erreicht werden. Das Gemisch wird nun 3 h bei 30 °C unter hellem Licht inkubiert.

Die Rhodopsinkinase kann währenddessen, auf die durch Belichtung aktivierten Rhodopsinmoleküle (Metarhodopsin II), unter ATP-Verbrauch Phosphatreste übertragen. Nach kurzer Zeit zerfällt das phosphorylierte, lichtaktivierte Rhodopsin (P-R\*) zu Opsin und all-*trans*-Retinal. Dies macht eine Regeneration mit 11-*cis*-Retinal erforderlich, so daß phosphoryliertes Rhodopsin im Grundzustand entsteht.

Es wird ein 4fach molarer Überschuß 11-*cis*-Retinal (20 mM in Ethanol absolut) in vollkommener Dunkelheit zugegeben, gefolgt von einer mindestens 12stündigen Inkubation bei RT im Dunkeln. Am Ende der Inkubationszeit werden erneut 100 µl für eine Konzentrationsbestimmung des Rhodopsins entnommen. Bei einem Anteil von über 95 % an regeneriertem Rhodopsin werden die PMBs im SS34-Rotor bei 4 °C und 20000 Upm für 40 min pelletiert, 2 mal mit Puffer 4 gewaschen und im gewünschten Volumen Puffer 4 aufgenommen. Aliquots von 1 ml in schwarzen Eppendorfgefäßen, umwickelt mit Aluminiumfolie können bei -70 °C gelagert werden.



#### 2.10.4. Herstellung von Retinaextrakt

Die Herstellung von Retinaextrakten wurde von Frau A. Cousin durchgeführt. Je 70 Retinen werden mit 100 ml Phosphatpuffer (70 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 70 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,2) versetzt. Dieser Ansatz wird 90 sek intensiv geschüttelt und anschließend 30 min auf Eis gerührt. Es folgte eine Zentrifugation im SS34-Rotor bei 4 °C und 20000 Upm für 20 min. Der Überstand wird in neue Zentrifugenröhrchen überführt und unter den selben Bedingungen erneut zentrifugiert. Der so entstandene Retinaextrakt wird aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

#### 2.10.5. Reinigung von Arrestin

Die Reinigung von Arrestin aus dem Rinderauge wird in Anlehnung an die Methode von Wilden et al. (1986b) durchgeführt. Sie beruht auf der Eigenschaft von Arrestin reversibel an gebleichtes, phosphoryliertes Rhodopsin zu binden.

Bei Rotlicht wird ein ROS-Pellet, welches 20 mg Rhodopsin entspricht, in 20 ml Lösung 1 mit einem Glas/Teflon-Homogenisator resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl 0,2 M ATP (pH 7,0) und 300 µl 50 mM GTP (pH 7,0) wird das Gemisch in ein klares 50 ml Zentrifugenröhrchen umgefüllt und bei Tageslicht und 30 °C für 20 min inkubiert. 40 ml Retinaextrakt werden zugegeben und das Gemisch für weitere 10 min unter den selben Bedingungen inkubiert.

Während der Belichtung wird Rhodopsin in Gegenwart von ATP phosphoryliert und bindet somit Arrestin. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 4 °C und 20000 Upm im 8.24 Rotor für 20 min. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 40 ml Lösung 2 resuspendiert, und es werden 200 µl 50 mM GTP (pH 7,0) hinzugegeben. Es folgt eine erneute Zentrifugation bei den selben Bedingungen für 40 min. Die Zugabe von GTP bewirkt durch Austausch mit dem an Transducin gebundenen GDP eine Dissoziation des nach Belichtung gebundenen Transducins. Der Waschvorgang wird noch dreimal ohne Zugabe von GTP wiederholt. Nun wird das Pellet in 8 ml Lösung 3 resuspendiert, wie vorher abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Pellet wird in 10 ml Lösung 4 aufgenommen. Dieses Gemisch wird bei 18 °C im Dunkeln über Nacht inkubiert, dabei zerfällt der Arrestin-Rhodopsin-Komplex. Es folgt, ebenfalls im Dunkeln, eine Zentrifugation für 30 min unter den vorherigen Bedingungen. Der Überstand enthält nun Arrestin. Durch erneute Zentrifugation unter den selben Bedingungen in neuen Zentrifugenröhrchen wird er von Membranresten und Kleinstpartikeln befreit. Die Arrestinlösung wird aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

## 2.11. Isoelektrische Fokussierung

Die Isoelektrische Fokussierung erfolgt mit dem Phast-System (Control Unit 220VAC, Pharmacia). Es werden Phast IEF-Gele mit einem pH-Bereich von 3-9 (Pharmacia) verwendet. Der Probenauftrag erfolgt mit 8x1 µl Sample Applicator Kämmen (Pharmacia) oben und unten gleichzeitig, so daß insgesamt 2 µl Probenvolumen geladen werden. Als Marker wird der Broad-pI-Kit, pH 3,5-9,3 (Pharmacia) in doppelter Konzentration wie vom Hersteller angegeben verwendet. Die Elektrophorese wird exakt nach den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Eine Visualisierung der Proteine erfolgt durch Anfärben mit GelCode oder Roti-Black (2.8.2.).

## 2.12. Massenspektrometrische Untersuchungen

Die zu vermessenen Proben werden in einer Konzentration von 0,5 bis 1 mg/ml in 10 mM Tris pH 7,5 eingesetzt. Proteinproben aus aufgelösten Kristallen werden wie unter 2.15.3 beschrieben vorbereitet.

### 2.12.1. Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI-TOF-MS)

Die MALDI-Untersuchungen und die Auswertung der Daten wurden am Institut für Enzymtechnologie (Prof. Dr. Kula, Heinrich Heine Universität Düsseldorf) von Dipl. Ing. A. Rodenbrock durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mir für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Es wurde ein lineares Flugzeitmassenspektrometer (ALADIM, Institut für Lasermedizin, Heinrich Heine Universität Düsseldorf) mit einem Stickstofflaser (337 nm, 1 Hz) verwendet. Der Fehlerbereich des Gerätes liegt bei 0,05 %-0,5 %, die standardmäßige Auflösung bei  $M/dM = 40$ . Die externe Kalibrierung erfolgte mit BSA (1,6 mg/ml; in 50 %  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 0,1 % TFA). Als Matrix diente eine Mischung aus 2,5-Dihydroxybenzoesäure (9 g/l) und 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure (1 g/l) in 20 % Acetonitril, 0,1 % TFA. Dabei wurden Probe und Matrix im Verhältnis 1:4, Kalibrant und Matrix im Verhältnis 1:6 gemischt.

### 2.12.2. Elektro Spray Ionisierung (ESI-MS)

Die ESI Untersuchungen und die Auswertung der Daten wurden am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie von PD Dr. H. Prinz durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mir für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Es wurde ein LCQ Elektrospray Massenspektrometer (Finnigan, MAT, USA), zum Probenauftrag ausgestattet mit einer Nanospray-Quelle (Prinz et al., in Vorbereitung), verwendet. Die massenspektrometrischen Daten wurden im Bereich von 1000 bis 2000 amu mit einer Genauigkeit von 100 ppm aufgenommen. Aus der im Massenspektrum erhaltenen Serie der mehrfach geladenen Ionen wurde mittels der m/z-Verhältnisse die Molekülmasse berechnet. Für die Berechnungen wurde die Finnigan Dekonvolutions-Software verwendet.

### 2.13. Edmann Abbau, N-terminale Proteinsequenzierung

#### *Probenvorbereitung*

Die zu sequenzierenden Proteine wurden auf ein Tris-Tricine-SDS-Gel (Schägger & von Jagow, 1987) geladen und anschließend auf PVDF-Membran geblottet (2.8.3.). Der Blot wurde mit 0,025 % (w/v) Coomassie R250 in 40 % Methanol gefärbt und zwecks Entfernung der Hintergrundfärbung mit 50 % Methanol entfärbt. Die Proteinbanden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die Blotstücke bei RT gelagert.

Die N-terminalen Proteinsequenzierungen und die Auswertung der Daten wurden am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie von Frau Anders durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mir für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Sequenzierung wurde nach Standardmethoden mit einem 473A Sequencer (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Jede Probe wurde 6 Abbauschritten unterzogen. Die Identifizierung der Abbauprodukte erfolgte durch HPLC über den Vergleich mit Standardsubstanzen.

### 2.14. Zentrifugations-Bindungs-Assay

Der Zentrifugations-Bindungs-Assay wird zur Aktivitätsbestimmung der rekombinanten Arrestine im Vergleich zum wildtypischen Arrestin eingesetzt und in Anlehnung an die von Kühn et al. (1984) beschriebene Methode durchgeführt.

Dieser Assay beruht auf dem Prinzip, daß wildtypisches Arrestin insbesondere an phosphoryliertes und lichtaktiviertes Rhodopsin bindet, nicht aber an unphosphoryliertes oder

unbelichtetes Rhodopsin. In gebundenem Zustand kann Arrestin demnach mit den ROS-Membranen oder PMBs durch Zentrifugation sedimentiert werden. Ungebundenes Arrestin ist nach der Zentrifugation im Überstand lokalisiert.

Rhodopsin-haltige Membranen werden mit Arrestin in Bindungspuffer (10 mM HEPES und 100 mM NaCl bzw. KCl, pH 7,5) unter Rotlicht gemischt, bei RT im Dunkeln (Negativkontrolle) oder unter Belichtung inkubiert und anschließend zentrifugiert (30 min, 50000 g, 4 °C, Rotor TLA-45). Der Überstand wird abgenommen und bis zur Analyse durch SDS-PAGE und/oder Westernblot bei -20 °C gelagert. Das Pellet wird in im doppelten Reaktionsvolumen Bindungspuffer unter Rotlicht resuspendiert, erneut zentrifugiert und in Probenpuffer für die Analyse im SDS-Gel und/oder Westernblot resuspendiert.

Es werden Rhodopsinkonzentrationen von 4 µM bis 200 µM (jeweils angegeben) und Arrestinkonzentrationen von 200 nM bis 800 nM (jeweils angegeben) eingesetzt. Das Gesamtvolumen beträgt respektive 50 µl oder 100 µl. Zur Verwendung kommen dunkeladaptierte gewaschene ROS-Membranen und *in vitro* phosphorylierte-ROS Membranen (PMBs). Die Belichtungszeit ist jeweils angegeben, sie beträgt zwischen 30 sek und 20 min.

## 2.15. Kristallisationsmethoden

Prinzip der Kristallisation ist es, hoch konzentrierte Proteinlösungen durch Zugabe von Fällungsmitteln langsam in einen übersättigten Zustand zu überführen, so daß sich Präzipitat oder Kristalle bilden. Für die Kristallisation von Arrestin wurde ausschließlich nach der Dampfdiffusionsmethode gearbeitet. Bei dieser Methode stehen ein Tropfen, der Protein und Fällungsmittel enthält, und eine Reservoirlösung mit höherer Fällungsmittelkonzentration über die Gasphase miteinander im Gleichgewicht. Da das Volumen des Reservoirs um ein Vielfaches größer als das des Tropfens ist, entspricht die Endkonzentration des Fällungsmittels im Tropfen im wesentlichen der Anfangskonzentration im Reservoir.

### 2.15.1. Kristallisation von wildtypischem Arrestin

Die Kristallisation von wildtypischem Arrestin aus Rinderaugen erfolgt nach Wilden et.al. (1997). Das zu kristallisierende Protein liegt in einem Puffer aus 10 mM HEPES und 800 mM KCl bei pH 7,2 vor, und wird mittels einer Centricon-30 Ultrafiltrationseinheit bis zu einer Proteinkonzentration von etwa 32-36 mg/ml bei RT konzentriert. Diese Arrestinlösung wird sofort oder nach Lagerung bei -20 °C (ohne Zusatz) für die Kristallisation verwendet.

Jede Arrestin-Präparation kristallisiert unter leicht unterschiedlichen Bedingungen, diese müssen somit optimiert werden. Die Besonderheit der hier beschriebenen Methode ist eine Veränderung der Tropfen-Zusammensetzung unabhängig vom Reservoir (U. Wilden, pers. Mitteilung).

#### **2.15.1.1. Ermittlung der optimalen Tropfen-Zusammensetzung**

10 µl konzentrierte Proteinlösung werden mit 7 µl des Puffers P6.1 und 2 µl 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM EDTA gemischt. Dieses Protein-Fällungsmittel-Gemisch stellt die Startzusammensetzung dar und wird während der Optimierungsprozedur bei 4 °C gelagert. Sukzessive Zugabe von Puffer P6.1 in 1 µl-Schritten (alle 3 Tage bis zu maximal 13 µl) erhöht die Fällungsmittel- und erniedrigt die Proteinkonzentration. Vom Startgemisch und nach jeder Zugabe von P6.1 werden jeweils 2 µl entnommen und als Tropfen für einen Kristallisationsansatz mit dem Reservoirpuffer 10:4 (2.3.1.) eingesetzt. Die optimalen Bedingungen sind erreicht, wenn im hängenden Tropfen nach 1-3 Tagen Kristalle entstehen. Die Kristallisation der jeweiligen Proteinpräparation wird nun mit diesen Tropfenbedingungen durchgeführt.

#### **2.15.1.2. Kristallisationsansätze**

Die Kristallisationsansätze werden nach der Methode des hängenden Tropfens in Eppendorfgefäße pipettiert und bei konstanter Temperatur (17 °C) inkubiert. Das Tropfenvolumen beträgt 2 µl oder 4 µl, das Reservoirvolumen entsprechend 50 µl oder 100 µl. Die Zusammensetzung des Reservoirs ist 10:4 oder 10:10,

wobei z.B. für 10:4 gilt: 10:4 entspricht A + B mit

A = 10 Volumeneinheiten Puffer P6.1

B = 4 Volumeneinheiten 100 mM HEPES; 800 mM KCl; pH 7,5

Ansätze über einem Reservoir von 10:4 führen zu vielen, kleinen Kristallen. Für Röntgenbeugungsexperimente sollte jedoch eine Mindestkristallgröße von 0,15 mm<sup>3</sup> gegeben sein. Zur Erzeugung von Kristallen geeigneter Größe werden Ansätze über einem Reservoir von 10:10 (2.3.1.) hergestellt, bei diesen Bedingungen entstehen zunächst keine Kristalle. Die Ansätze werden 3-4 Wochen stehen gelassen. Am Ende dieser Inkubationszeit werden die Ansätze geöffnet und das Reservoir gegen das gleiche Volumen 10:4 ausgetauscht. Nun wachsen wenige aber dafür große Kristalle.

### 2.15.2. Kristallisation von rekombinantem Arrestin

Die Kristallisation von rekombinantem Arrestin aus *S. cerevisiae* mit den verschiedenen Fusionen am N- und C-Terminus erfolgt in Anlehnung an die oben beschriebene Kristallisation von wildtypischem Arrestin.

Das zu kristallisierende Protein liegt in einem Puffer von 10 mM HEPES und 800 mM NaCl bei pH 7,5 vor. Die Proteinlösung wird bis zu einer Endkonzentration von ~10 bis ~35 mg/ml mit Ultrafiltrationseinheiten (Ausschlußgröße 10 kDa) bei 4 °C konzentriert. Die erreichbaren Endkonzentrationen hängen von der Protein-Ausgangsmenge (Ausbeute der Proteinreinigung) und dem Totvolumen der verwendeten Ultrafiltrationseinheit ab. Die optimalen Tropfen-Zusammensetzung wird bei den rekombinanten Arrestinen analog zum wildtypischen Arrestin eingestellt (2.15.1.1.). Lediglich die Ausgangsmenge an Puffer P6.1 in Startgemisch beträgt hier 10 µl.

Zusätzlich zur Variation der Fällungsmittel- und Proteinkonzentration wird auch der Einfluß des Reservoirpuffers überprüft. Dazu werden nach jedem Schritt Kristallisationsansätze über der folgenden Serie von Reservoirpufferverdünnungen gemacht:

10:3, 10:4, 10:5, u.s.w. bis 10:10. Diese Variationen der Reservoirzusammensetzung bewirken unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeiten in den Kristallisationsansätzen. Die Ansätze werden mit den ermittelten optimalen Tropfen- und Reservoirbedingungen wie unter 2.15.1.2. beschrieben erstellt. Unter diesen Bedingungen entstehen nach 1-3 Tagen Kristalle.

### 2.15.3. Auflösen von Kristallen für analytische Zwecke

Zur Ernte eines Kristallisationsansatzes werden die Kristalle im hängenden Tropfen samt Mutterlauge aufgenommen. Um nicht-kristallisiertes Protein von den Kristallen zu trennen werden diese in Umsetzungspuffer überführt und durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge (2 min bei 13000 Upm und 4 °C) sedimentiert. Die Kristalle werden erneut in frischem Umsetzungspuffer aufgewirbelt und wie beschrieben zentrifugiert. Nach den zwei Waschschritten wird das Kristallpellet in 500 µl Puffer 10/100 12 bis 16 h bei 17 °C inkubiert und anschließend für 1 min mit dem Ultraschallbad behandelt. Ungelöste Bestandteile werden durch Zentrifugation entfernt und erneut in Puffer 10/100 aufgenommen. Der Überstand enthält das gelöste Arrestin.

Für massenspektroskopische Untersuchungen von 6His-Fusionsproteinen mit MALDI (2.12.1.) bzw. ESI (2.12.2.) ist die vollständige Entfernung der PEGs und der Salze aus der Proteinlösung erforderlich. Die 6His-getaggten Proteine werden mittels IMAC (2.9., 1 ml Säulenvolumen) gereinigt, umgepuffert in 10 mM Tris pH 7,5 und das Volumen bis zum Erreichen einer Proteinkonzentration von 0,5 bis 1 mg/ml reduziert

## **2.16. Kristallographische Methoden**

### **2.16.1. Messung von Röntgen-Beugungsdaten unter Kryo-Bedingungen**

Die Messungen von Röntgen-Beugungsdaten unter Kryobedingungen ( $T = 100\text{ K}$ ) sowie die Auswertung der Daten wurden von J. Granzin durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mir für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Alle Datensätze von nativen und auch derivatisierten Kristallen wurden, mit Ausnahme von "PIP"-Arrestin-6His, an einem Drehanoden-Röntgengenerator, Typ GX21, 40 kV und 50 mA (Elliot Marconi Avionics) aufgenommen. Das Arrestin-6His "PIP"-Derivat wurde am Synchrotron in Daresbury, U.K. (Station PX7.2, SERC) vermessen.

### **2.16.2. Präparation von Kristallen für die Kryokristallographie**

Die Arrestinkristalle werden in 0,1 % (v/v) Glutaraldehyd in Umsetzungspuffer 5 min getränkt, mit der „Loop-Mounting“ Methode (Teng, 1990) entnommen, und im Stickstoffstrom bei 100 K schockgefroren. Glutaraldehyd ist kein klassisches Kryoprotektat, jedoch ist diese Substanz bekannt dafür, Kristalle zu stabilisieren (Quioco & Richards, 1964). Das bifunktionale Glutaraldehyd verbindet kovalent Lysinreste der Proteinmoleküle.

Zur Herstellung von Schweratomderivaten werden die entsprechenden Schweratomverbindungen in Umsetzungspuffer gelöst und die Kristalle darin getränkt. Die Tränkzeit ist dabei abhängig von der verwendeten Schweratomverbindung und ist jeweils angegeben.

### 3. Ergebnisse

Ziel der Arbeit ist, durch heterologe Expression ein homogenes, wildtypisches Arrestin zu erzeugen. Funktionalität und Faltung des rekombinanten Proteins werden durch biochemische und biophysikalische Analysen kontrolliert. Dieses Protein ist die Basis für die Erzeugung von Mutanten, die in Anlehnung an die Röntgenstruktur entwickelt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das wt Arrestin am N- und C-Terminus verschieden modifiziert und exprimiert. Diese Arrestine wurden nicht wie Arrestin aus dem Rinderauge durch Bindung an Rhodopsin, sondern durch Bindung über ihre Modifikation affinitätschromatographisch gereinigt.

#### 3.1. Überexpression von Arrestin in *Escherichia coli*

Als Wirtsorganismus für heterologe Proteinexpression hat *E. coli* Vorteile wie z.B. schnelles Zellwachstum und sehr hohe Expressionsraten. Die kommerziell erhältlichen Expressionssysteme bieten die Möglichkeit Arrestin als Fusion an verschiedene Affinitätspeptide oder Fusionspartner zu erzeugen. Vorteil dieser Art der rekombinanten Proteinexpression ist die vereinfachte Reinigung von Arrestin über Affinitätschromatographie. Zusätzlich wird eine indirekte Detektion des heterolog exprimierten Proteins im Westernblot über Antikörper bzw. spezifische Konjugate gegen den Fusionspartner möglich. Ein weiterer Vorteil dieser Art der Expression ist die Beeinflussung der Löslichkeit durch den Fusionspartner (La Vallie et al., 1993).

Nachteile sind, daß einige Proteine nicht-bakteriellen Ursprungs nach Expression in *E. coli* unlösliche Einschußkörper, bestehend aus aggregiertem Protein, bilden. Viele eukaryotische Proteine wie Arrestin werden in ihrem natürlichen Wirt post-translational prozessiert oder modifiziert, nicht aber in *E. coli*. Diese Modifikationen beeinflussen oft die Faltungsaktivitäten und die biologische Funktion der Proteine. Ein Einfluß der N-terminalen Acetylierung von Arrestin auf die Faltung oder Funktion ist bislang unbekannt. Für die Erzeugung von nativ-eukaryotischen Proteinen ist auch die Entfernung des N-terminalen Methionins wichtig. In *E. coli* ist dies jedoch abhängig von der darauf folgenden Aminosäure in der Polypeptidkette. Proteine wie Arrestin, mit Lysin an zweiter Position, behalten das N-terminale Methionin (Sherman et al., 1985). Zur Bildung von Proteinaggregaten kann auch die Tatsache beitragen, daß das Wirtscytosol keine geeignete Umgebung für das Zielprotein darstellt, Cysteinbrücken z.B. nicht möglich sind. Ebenso kann durch extreme Überproduktion die Löslichkeitsgrenze für das jeweilige Protein überschritten werden (Mitraki & King, 1989).

Expressionsbedingungen haben entscheidenden Einfluß auf die Löslichkeit des Zielproteins, wobei Wachstumsrate, Expressionsrate und vor allem die Temperatur wichtige Faktoren sind



(Thatcher & Panayotatos, 1986; Schein & Noteborn, 1988; Kopetzki et al., 1989). Es gibt viele experimentelle Ansätze, um die Löslichkeit von in *E. coli* exprimierten Proteinen zu erhöhen, jedoch muß für jedes Protein erneut versucht werden ein Optimum zu finden (Hockney, et al., 1995).

In der Regel bringt die Produktion eines Fremdproteins einen Wachstumsnachteil für die betreffende *E. coli* Zelle mit sich. Einige heterolog exprimierte Proteine haben lethale Effekte auf den Expressionsstamm. Generell ist es daher wünschenswert, die Fremdprotein-Biosynthese gezielt zu regulieren, d.h. es werden Promotoren verwendet, deren Aktivität durch Repressoren blockiert werden können. Zur Produktion des Zielproteins muß diese Repression jedoch in einem bestimmten Wachstumsstadium der *E. coli* Zellen gezielt aufgehoben werden, am einfachsten durch Zugabe eines nicht metabolisierbaren Induktors.

In dieser Arbeit fanden drei verschiedene *E. coli* Expressionssysteme Verwendung, wobei jedes auf einer anderen Art der Regulation beruht.

### **3.1.1. Expression von Arrestin als N-terminale Glutathion-S-Transferase Fusion im Vektor pGEX-4T-1**

pGEX-Vektoren werden in *E. coli* zur Expression fremder Polypeptide als N-terminale Fusion mit Glutathion-S-Transferase (GST) verwendet. GST (26 kDa) ist ein cytoplasmatisches, eukaryotisches Protein und wurde ursprünglich aus *Schistosoma japonicum* kloniert (Smith et al., 1986). Im Allgemeinen sind diese Fusionsprodukte löslich und können leicht unter nativen Bedingungen mittels GST-Affinitätschromatographie gereinigt werden (Smith & Johnson, 1988). Eine Abspaltung des Zielproteins von der GST nach Expression wird bei Verwendung von pGEX-4T-1 durch die sequenzspezifische Protease Thrombin ermöglicht, deren Erkennungssequenz unmittelbar upstream der MCS des Vektors lokalisiert ist. Das Expressionssystem bietet den Vorteil einer induzierbaren Expression über den starken *tac* Promotor, welcher durch das Laktose-Analogon Isopropyl  $\beta$ -D-Thiogalaktosid (IPTG) induziert wird. Der Vektor enthält das *lac I<sup>q</sup>*-Gen, dessen Genprodukt, der *lac* Repressor, zur negativen Regulation des Promotors notwendig ist. Somit ist fast jeder *E. coli* Stamm als Wirtsstamm verwendbar. Als Expressionsstämme bieten sich Protease-defiziente Stämme (wie *E. coli* BL21) an, da so die Degradation des Zielproteins vermindert werden kann. Alternativ ermöglicht die Expression im Stamm W3110 die Erzeugung großer Biomasse, da dieser Stamm zu sehr hohen Zelldichten heranwächst.

### 3.1.1.1. Klonierung von Arrestin in den Vektor pGEX-4T-1

Die kodierende Sequenz des Arrestin Gens wurde mit den PCR-Primern #1 und #2 (2.7.6.1.) durch PCR amplifiziert. Als Template DNA diente der Vektor pBC-Arrestin (M.Lohse, Würzburg), dieser enthält die kodierende Arrestin Sequenz (Shinohara et al., 1987). Mittels der PCR-Primer wurden die Restriktionsschnittstellen BamHI (am 5'Ende) und XhoI (am 3'Ende) eingeführt. Das ~1,2 kb PCR-Produkt wurde unter Benutzung des SURE-Clone-Ligation Kits in den Vektor pUC18 (Anhang) zwischenkloniert (Konstrukt L1aI20). Zwecks Verifizierung der DNA-Sequenz wurden die Randbereiche des Vektors L1aI20 mittels der Sequenzierungsprimer #3 und #4 (2.7.6.2.) unter Verwendung des GATC-Systems sequenziert und bestätigt. Die Umklonierung in den Expressionsvektor pGEX-4T-1 (Anhang) erfolgte über die BamHI und die XhoI Schnittstellen. Der Vektor L1aI20 wurde dazu zum einen partiell mit BamHI verdaut, wobei das entstandene ~1 kb Fragment für die weitere Klonierung isoliert wurde. Ein Partialverdau war notwendig, da die Restriktionsschnittstelle BamHI auch innerhalb des benötigten ~1 kb-Fragmentes vorhanden ist.

Das Konstrukt L1aI20 wurde außerdem mit XhoI verdaut, was zu einem ~500 bp Fragment führte. In den mit BamHI aufgeschnittenen und dephosphorylierten Vektor pGEX-4T-1 wurde zunächst das 1 kb-BamHI Fragment ligiert und dessen Orientierung überprüft (Konstrukt L6.8). Der Vektor L6.8 wurde anschließend mit XhoI geschnitten, dephosphoryliert, mit dem ~500 bp XhoI Fragment ligiert und dessen Orientierung überprüft (Konstrukt L8.14). Der mittlere, nicht sequenzierte Bereich (~600bp) des ~1,2 kb Arrestin Gens wurde im Vektor pGEX-4T-1 gegen korrespondierende Sequenzen aus pBC-Arrestin ausgetauscht, dabei wurden die Restriktionsschnittstellen NsiI und BsmI verwendet (Konstrukt 9.13).

Der Vektor 9.13 stellt nun das Endkonstrukt dar: Das Arrestin Gen von ~1,2 kb wurde im gleichen Leseraster wie das GST-Gen zwischen die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI des Polylinkers in den Vektor pGEX-4T-1 kloniert. Sequenzbereiche, die mittels PCR amplifiziert wurden und nicht gegen Fragmente des Originalplasmids ausgetauscht werden konnten, wurden durch Sequenzierung bestätigt.

Zur Expression des Fusionsproteins wurde der Vektor 9.13 in die Protease-defizienten Expressionsstämme BL21::DE3, BL21::DE3 [plysS], BL21::DE3 [plysE], bzw. W3110 transformiert.

### 3.1.1.2. Expressionsbedingungen für Arrestin im Vektor pGEX-4T-1

Die Kultivierung der Expressionskulturen wurde jeweils wie unter 2.5. beschrieben durchgeführt. Eine Auswertung der Versuche erfolgte durch Analyse von Überständen und Pellets in PBS-Puffer (2.5.1.) sowie Gesamtzellextrakten mittels SDS-PAGE (2.8.1.).

Kontrollexpressionen im kleinen Maßstab (25 ml Kulturvolumen bei 37 °C und Induktion mit 0,1 mM IPTG) ergaben eine hohe Überexpression von GST-Arrestin mit vorwiegender Lokalisation des Proteins in der unlöslichen Fraktion. Nur ein geringer Teil an löslichem Protein befand sich im Überstand (Daten nicht gezeigt). Für die Optimierung der Expressionsbedingungen wurden verschiedene Temperaturen, unterschiedliche Induktionszeiten und auch eine Variation der Induktionsstärke getestet. Diese Parameter haben Einfluß auf die Löslichkeit stark exprimierter Proteine (Marston, 1986; Schein & Noteborn, 1988; Schein, 1989; Schein, 1990). Zusätzlich wurde der Einfluß verschiedener Expressionsstämme untersucht. Folgende Bedingungen wurden in Kulturvolumina von 25 ml bis 100 ml getestet:

Temperatur:	20 °C, 25 °C, 28 °C und 37°C
Induktion mit IPTG:	0,05 mM, 0,1 mM und 1 mM
Induktionsdauer:	0,5 bis 21 h (bei 28 °C und 0,1 mM IPTG)
Expressionsstämme:	BL21::DE3, BL21::DE3 [plysS], BL21::DE3 [plysE], und W3110

Temperatur und Induktionsstärke wurden bei allen *E. coli* Stämmen in den möglichen Kombinationen getestet. Die Induktionsdauer betrug 3 h.

In verschiedenen Ansätzen konnte reproduzierbar gezeigt werden, daß weder eine Änderung der Expressionstemperatur, noch eine Variation der Induktionsstärke in verschiedenen Stämmen das Verhältnis von löslichem Protein zu unlöslichem Protein im Pellet beeinflussen. Die Expressionsreihe in Abhängigkeit von der Zeit läßt keine zeitabhängige Verteilung des Fusionsproteins auf lösliche und unlösliche Fraktion erkennen.

Die Expressionsbedingungen für Großkulturen ergaben sich daher wie folgt:

Als Expressionsstamm wird BL21::DE3 [plysS] eingesetzt. Dieser Protease-defiziente Stamm bietet den Vorteil der effizienten und einfachen Zellyse, da das enthaltene Plasmid *plysS* eine Produktion von intrazellulärem Lysozym bewirkt. Die Induktionsparameter wurden auf 0,1 mM IPTG und eine Dauer von 4 Stunden bei einer Expressionstemperatur von 28 °C festgelegt.

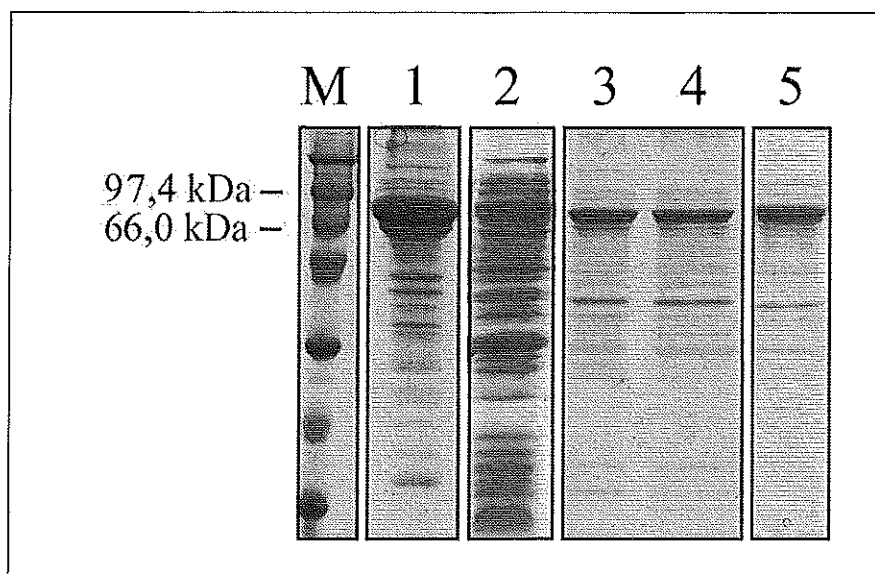
### **3.1.1.3. Zellaufschluß und Reinigung des Fusionsproteins GST-Arrestin aus der löslichen Fraktion, sowie anschließende Isolation von Arrestin**

Der Einfluß unterschiedlicher Puffer beim Zellaufschluß auf die Löslichkeit des Fusionsproteins wurde durch Variation von Ionenstärke und Puffersubstanz getestet. Eingesetzt wurden Arrestin-Puffer, ½ fach Arrestin-Puffer, PBS und hochreines Wasser. Da, trotz fehlender Puffereigenschaften, Arrestin in Wasser gut löslich und stabil ist (U. Wilden,

pers. Mitteilung), fand auch hochreines Wasser Anwendung bei Zellaufschluß und Proteinreinigung. Der Zusatz von Additiven wie DTT (5 mM) und Triton X-100 (0,1 % v/v) wurde ebenfalls untersucht. Die Auswertung der Versuche erfolgte wiederum durch Analyse von löslicher und unlöslicher Fraktion (2.5.1.).

In keinem der untersuchten Puffer konnte eine maßgebliche Erhöhung der Löslichkeit des Fusionsproteins festgestellt werden.

Die Analyse der Fraktionen nach Verwendung von PBS ist in der Abb. 3.1. gezeigt. Für weitere Experimente wurde Arrestin-Puffer oder PBS (siehe Pharmacia-Handbuch) verwendet. Unabhängig vom verwendeten Puffer konnte reproduzierbar das Fusionsprotein (~80 kDa) durch wiederholte Extraktion (bis zu zehnmal) der unlöslichen Fraktion (im Folgenden als Pellet bezeichnet) in Lösung gebracht werden (Abb. 3.1. Spuren 2-5). Bei jedem Extraktionsschritt ließ sich in etwa die gleiche Menge Fusionsprotein (etwa 10 %) aus dem Pellet herauslösen. Eine Erklärung wäre das Entstehen von Membranvesikeln nach dem Aufschluß der Zellen, in denen ein Teil des Cytoplasmas eingeschlossen und durch Zentrifugation sedimentiert wird. Durch Ultraschallbehandlung öffnen sich diese Vesikel. Da die Menge an extrahierbarem Protein aber bei jedem Schritt gleich war, ist die folgende Möglichkeit wahrscheinlicher: Während der Expression wurde die Löslichkeitsgrenze des Fusionsproteins überschritten, wodurch Proteinaggregate entstanden. Aus solchen Aggregaten läßt sich ein Protein nur bis zu seiner thermodynamischen Löslichkeitsgrenze erneut lösen, d.h. es stellt sich bei wiederholter Extraktion immer wieder das selbe Gleichgewicht zwischen Überstand und Pellet ein.

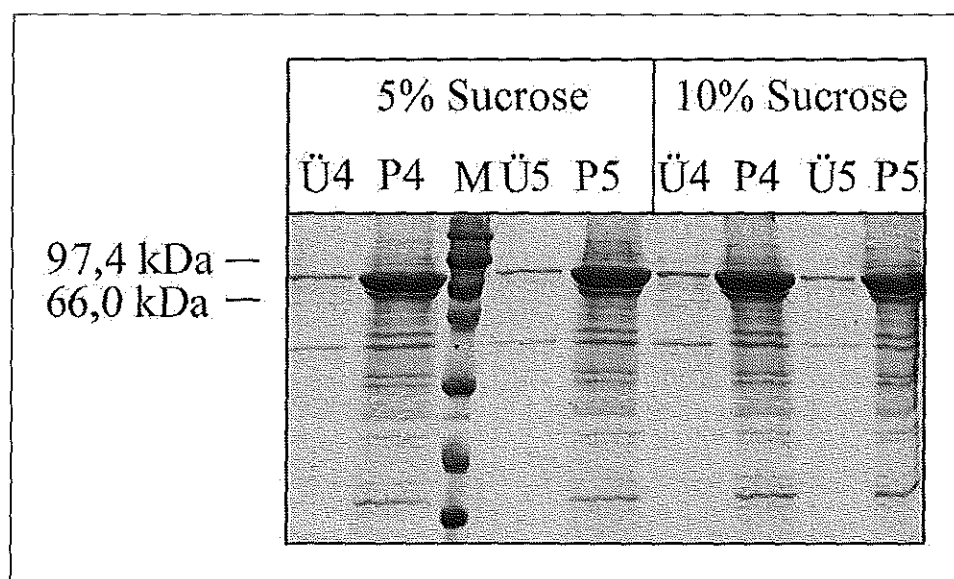


**Abbildung 3.1.:** Darstellung von löslichen und unlöslichen Fraktionen in PBS des Klon 9.13 (Expressionsstamm BL21::DE3 [plysS]) im Coomassie gefärbten SDS Gel (15%). Spur M zeigt den HMW Rainbow Marker. 1. Pellet nach 2. Extraktion; 2. Überstand 1; 3. Überstand 2; 4. Überstand 3; 5. Überstand 5

Zusätze wie Glycerin, Detergenzien, L-Arginin oder Glukose beeinflussen die Löslichkeit von Proteinen z.B. durch stabilisierende Wirkung (Gekko & Timasheff, 1981; Smith et al., 1978; Wingfield, 1995; Schein, 1990), daher wurden folgende Zusätze in verschiedenen Konzentrationen in Arrestin-Puffer bei Reextraktionsversuchen der unlöslichen Pelletfraktion eingesetzt:

<u>Glycerin:</u>	5 %, 10 % und 15 % (v/v)	<u>Sucrose:</u>	5 % und 10 % (v/v)
<u>L-Arginin:</u>	0,25 M, 0,5 M, 0,75 M	<u>Glukose:</u>	5 % und 10 % (v/v)
<u>Octyl-Glycosid:</u>	5 mM, 10 mM, 15 mM und 20 mM		

Ebenso wurde in Arrestin-Puffer der Einfluß des pH-Werts (zwischen 5 und 9) untersucht. Es wurde für die verschiedenen Tests die gleiche, unlösliche Fraktion verwendet. Eine Änderung der Löslichkeit bzw. Stabilität des Fusionsproteins durch einen der Zusätze war nicht festzustellen. Das SDS-Gel der Versuchsreihe mit Sucrose zeigt jeweils die Überstände und Pellets der 4. und 5. Extraktion (Abb. 3.2.).



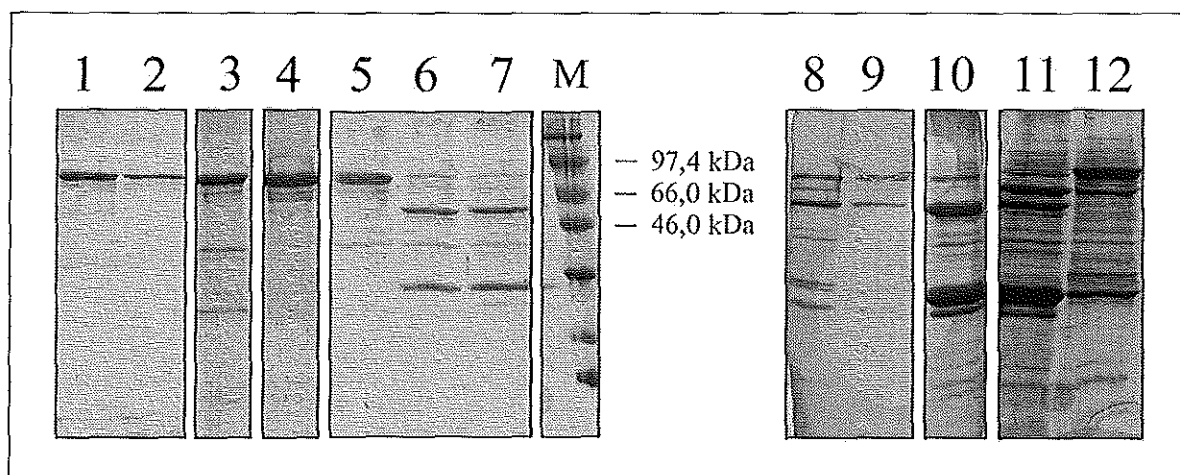
**Abbildung 3.2.:** Extraktionsversuche von Pellets (unlösliche Fraktionen nach dritter Extraktion) des Klons 9.13 (Stamm BL21::DE3 [plysS]) mit 5 % bzw. 10 % Sucrose in Arrestin-Puffer. Coomassie gefärbtes 15%iges SDS Gel. In Spur M ist der High Molekular Weight Marker aufgetragen. Ü4, Ü5: Überstände nach 4. bzw. 5.Extraktion  
P4, P5: Pellets nach 4. bzw. 5. Extraktion

Die Reinigung des löslichen GST-Arrestins erfolgte über Glutathion-Sepharose-Chromatographie wie unter 2.9. (Tab. 2.6.) beschrieben. Die mittels verschiedener Zellaufschlußpuffer (Arrestin-Puffer, PBS oder Wasser) extrahierten Proteine konnten in vergleichenden Chromatographien erfolgreich gereinigt werden. Dabei war kein Einfluß der Pufferzusammensetzung auf das Reinigungsergebnis festzustellen. GST-Arrestin eluierte sauber, nur wenige verunreinigende Proteine in geringer Konzentration sind im SDS-Gel erkennbar (Abb. 3.3 Spuren 1, 2). Die Proteinkonzentration der Eluate ist jedoch gering, vergleicht man die auf die Säule aufgetragenen Proteinmengen (siehe Fusionsprotein in den Überständen, Abb. 3.1) mit der eluierten Menge an Fusionsprotein. Die Analyse der Matrix

nach Elution (Abb. 3.3 Spur 3) zeigt deutlich einen erheblichen Verlust an Fusionsprotein, der wahrscheinlich auf Aggregation des Proteins auf der Säule zurückzuführen ist. Die Konzentration der Eluate mittels Ultrafiltration resultierte oft im vollständigen Verlust des Fusionsproteins durch Präzipitation auf der Konzentratormembran in Form von gelblichen Nadeln (Abb. 3.3, Spur 4).

Bei der Isolierung von Arrestin stellte die abschließende enzymatische Abspaltung des GST-Anteils durch die Protease Thrombin, sowie die daran anschließende chromatographische Trennung beider Proteine das Hauptproblem dar. Die in Kapitel 2.9.2. beschriebenen zwei Möglichkeiten der Thrombinspaltung (gebunden an Säulenmaterial oder in Lösung) wurden wiederholt und auch unter variierenden Bedingungen angewendet, wobei keine zu löslichem, gereinigten Arrestin führte.

Zum einen verlief die Spaltung mit der Protease Thrombin nicht vollständig. Dabei war weder die Thrombinkonzentration, noch die Temperatur (4 °C oder RT), noch die absolute Dauer des Verdaus (1 h bis zu 21 h) relevant. Ohne Einfluß war auch, ob das Fusionsprotein in Lösung oder an Säulenmaterial gebunden vorlag. Nach Verdau des Fusionsproteins in Lösung (Abb. 3.3 Spuren 5 - 7) erhielt man im nachfolgenden Chromatographieschritt (GST-Glutathion-Sepharose-Chromatographie oder Anionenaustausch-Chromatographie mittels FPLC) lediglich GST und Fusionsprotein. Das abgespaltene Arrestin präzipitierte auf der Säule (Daten nicht gezeigt). Spur 8 in Abb. 3.3 zeigt das erste Eluat nach einem Thrombinverdau auf der Säule, ohne Glutathion konnten sowohl Arrestin, als auch GST und Fusionsprotein eluiert werden.



**Abbildung 3.3.:** Ausschnitte von 15 %igen, Coomassie-gefärbten SDS Gelen. Gezeigt sind Proben verschiedener Reinigungsschritte von GST-Arrestin nach Glutathion-Sepharose-Chromatographie sowie Proben von Thrombinverdauschritten, jeweils in PBS. Die Spur M zeigt den HMW Rainbow Marker.

Reinigung von GST-Arrestin:

1. Eluat 1; 2. Eluat 2; 3. Sepharose nach Elution mit Glutathion; 4. Präzipitat auf der Membran einer Ultrafiltrationseinheit;

Thrombinverdau von eluiertem GST-Arrestin in Lösung:

5., t=0; 6. Spaltungsansatz, t=1h; 7. Spaltungsansatz, t=2h;

Thrombinverdau von GST-Arrestin auf der Säule:

8. Eluat 1 nach Thrombinverdau; 9. Eluat 2 nach Thrombinverdau; 10. Sepharose nach Thrombinverdau und Elution ohne Glutathion

Konzentrierte Proteinproben:

11. auf der Säule geschnittenes Fusionsprotein; 12. ungeschnittenes Fusionsprotein

An Säulenmaterial gebundenes Protein ließ sich nicht vollständig wieder eluieren. Dies gilt sowohl für das Fusionsprotein GST-Arrestin, als auch nach Thrombinverdau für GST und Arrestin alleine. Abb. 3.3 Spuren 3, 10 zeigen jeweils Matrixproben nach Elution, d.h. auf der Säule ausgefallenes Protein.

Auf der Säule geschnittenes, sowie ungeschnittenes Fusionsprotein wurde jeweils nach Elution und Umpufferung konzentriert. Die Spuren 11, 12 der Abb. 3.3 zeigen konzentrierte Proben. Man erkennt zusätzlich zur Arrestin-Bande bei etwa 50 kDa und der GST-Arrestin-Bande bei etwa 80 kDa eine hohe Anzahl an kontaminierenden Proteinen.

Zusammenfassend ergibt sich folgendes: Der lösliche Anteil des in *E. coli* exprimierten GST-Arrestin Fusionsproteins war gering und in Lösung instabil. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die Expression und Reinigung des GST-Arrestin Fusionsproteins aus *E. coli* kein qualitativ oder quantitativ ausreichendes Material für Kristallisation oder Aktivitätstests liefert. GST als Fusionspartner hat unter den hier beschriebenen Bedingungen nicht das gewünschte Resultat, d.h. eine gute Löslichkeit des Fusionsproduktes sowie Reinigung des Arrestins zur Homogenität über GST-Glutathion-Chromatographie erbracht.

### **3.1.2. Expression von Arrestin mit N-terminaler MRGS-6His Fusion im Vektor pQE-30**

Der Vektor pQE-30 bietet die Möglichkeit ein MRGS-6-Histidin-Peptid N-terminal an das Zielprotein zu fusionieren. Die 6 Histidin Reste besitzen eine bemerkenswerte Affinität für 2-wertige Metallionen, insbesondere Nickelionen. Somit ist eine schnelle Reinigung mittels IMAC möglich (2.9.1.). Die sehr hohe Expressionsrate von 6His-Proteinen in *E. coli* unter Verwendung von pQE Vektoren basiert auf dem T5 Promotor Transkriptions-Translations System. Die sehr hohe Transkriptionsrate des T5 Promotors kann nur durch große Mengen des lac-Repressor-Proteins effizient reprimiert werden. Daher ist die Expression im *E. coli* Stamm M15, der zur konstitutiven Expression des lac-Repressor-Proteins das Plasmid pREP4 enthält, optimal (Farabaugh, 1978). Die Induktion des Fusionsproteins kann schnell durch die Zugabe von IPTG erfolgen.

Die Regulation der Expression sowie der Fusionspartner können einen entscheidenden Einfluß auf die Löslichkeit des erzeugten Zielproteins haben (3.1.), so kann der Fusionspartner z.B. die Faltung des Zielproteins beeinflussen. Für einige Proteine ist bekannt, daß die Modifikation mit 6 Histidinen die Struktur und Funktion nicht beeinflußt (Oswald et al., 1994; Janknecht et al., 1991; Watkins et al., 1997; Guergova-Kuras et al., 1999). So entfällt der Einsatz einer Protease zur Entfernung des Peptids und die Reinigungszeit verkürzt sich deutlich, was allgemein eine positive Auswirkung auf die Löslichkeit und Aktivität von Proteinen hat.

### 3.1.2.1. Klonierung von Arrestin in den Vektor pQE-30

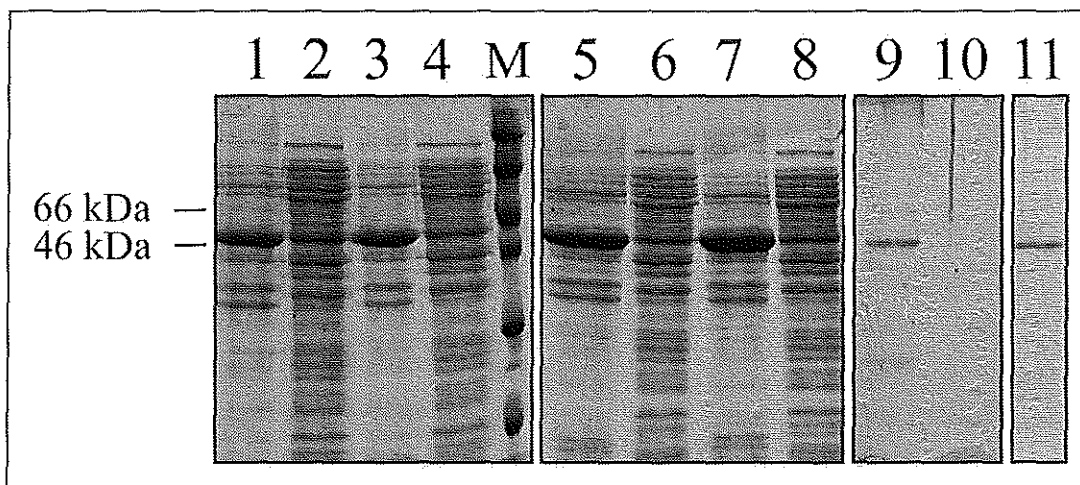
Die ~1,2 kb kodierende Arrestin Sequenz wurde aus dem Konstrukt 9.13 (Arrestin im Vektor pGEX-4T-1, 3.1.1.1.) im gleichen Leseraster hinter die, für das MRGS-6His-Peptid kodierenden Sequenzen, zwischen die BamHI und die SmaI Schnittstelle des Polylinkers in den Vektor pQE-30 (Anhang) umkloniert. Der Vektor 9.13 wurde zunächst partiell mit BamHI verdaut (3.1.1.1.) wobei das entstehende ~1 kb Fragment isoliert wurde. Parallel wurde der Klon 9.13 mit NotI linearisiert, die Einzelstrangüberhänge der entstehenden, sogenannten klebrigen Enden enzymatisch entfernt und mit NarI ein etwa ~930 bp großes Fragment mit 5' NarI-klebrigem und 3' stumpfem Ende ausgeschnitten. Das ~1 kb BamHI-Fragment wurde in den mit BamHI aufgeschnittenen und dephosphorylierten Vektor pQE-30 ligiert und die Orientierung überprüft (Konstrukt 22.1). Dieses Konstrukt wurde nun mit den Enzymen NarI und SmaI geschnitten, dephosphoryliert und mit dem ~930 bp Fragment ligiert (Konstrukte 26.3 und 26.4, durch Schneiden mit Restriktionsenzymen verifiziert). Zur Expression wurde der Vektor 26.3 in den Expressionsstamm M15 [pREP4] transformiert.

### 3.1.2.2. Expression und Reinigung von MRGS-6His-Arrestin im Vektor pQE-30

Die Kultivierung der Expressionskulturen wurde wie in Kapitel 2.5. beschrieben durchgeführt. Zur Optimierung wurde in jeweils 200 ml Kulturvolumen bei Temperaturen von 25 °C, 30 °C und 37 °C die Expression verfolgt. Nach Induktion mit 0,1 mM IPTG wurden alle 30 min bis zu maximal 5 h 15 ml-Proben entnommen. Zur Auswertung wurden Überstände und Pellets mittels SDS-PAGE analysiert. Die Zellen wurden mit Bindungspuffer aufgeschlossen. Eine Versuchsreihe bei 37 °C im Zeitraum von 1,5 h bis 3 h zeigt die Zunahme der MRGS-6His-Arrestin Bande (bei etwa 50 kDa) in der Pelletfraktion in Abhängigkeit von der Zeit (Abb. 3.4., Spuren 1, 3, 5, 7). Diese Zeitabhängigkeit war jedoch nicht immer reproduzierbar. Die korrespondierende Bande im Überstand zeigt unabhängig von der Expressionsdauer jeweils die gleiche Stärke (Abb. 3.4. Spuren 2, 4, 6, 8).

Die Reinigung des MRGS-6His-Arrestins aus der löslichen Fraktion erfolgte analog wie in Kapitel 2.9. (Tab. 2.6.) beschrieben. Die Eluatfraktionen enthielten neben dem MRGS-6His-Arrestin noch kontaminierende Proteine, die Ausbeute ist sehr gering (Abb. 3.4., Spuren 9, 10). Während der Eluat-Konzentrierung präzipitierte, wie auch bei der GST-Fusion beobachtet, das Protein in Form von gelblichen Nadeln auf der Membran der Ultrafiltrationseinheit. Die Analyse des löslichen Retentats zeigt, daß die MRGS-6His-Arrestin Konzentration im Vergleich zur Konzentration im Ausgangs-Eluat nicht erhöht werden konnte, obwohl das Volumen um den Faktor 4 reduziert wurde (Abb. 3.4. Spur 11, in den Spuren 9-11 wurden äquivalente Volumina aufgetragen).





**Abbildung 3.4.:** 12%ige Coomassie gefärbte SDS Gele mit verschiedenen Proben der MRGS-6His-Arrestin Expression (1-8) und Reinigung (8-10). In Spur M ist der HMW Rainbow Marker aufgetragen,  
Pelletfraktionen nach Expression bei 0,1 mM IPTG und 37°C: 1. 1,5h; 3. 2h; 5. 2,5h; 7. 3h  
Überstände nach Expression bei 0,1 mM IPTG und 37°C: 2. 1,5h; 4. 2h; 6. 2,5h; 8. 3h  
Eluate nach IMAC: 9. Eluat 1; 10. Eluat 2  
 11. vierfach konzentriertes Eluat

Abschließend läßt sich wie für die GST-Arrestin Fusion zusammenfassen, daß die Expression und Reinigung des MRGS-6His-Arrestin Fusionsproteins aus *E. coli* nur geringe Mengen an löslichem, instabilem Protein liefert.

### 3.1.3. Expression von Arrestin mit C-terminaler StrepTagI Fusion im Vektor pASK75

Das pASK75 Expressionssystem ermöglicht die C-terminale Fusion des StrepTagI-Peptids. Nach Reinigung werden so ausschließlich Fusionsproteine der vollen Aminosäurenlänge gewonnen. Mit N-terminal fusionierten Affinitätspeptiden werden auch C-terminal verkürzte Proteine gereinigt. Diese Verkürzungen entstehen durch vorzeitige Termination von Transkription oder Translation.

Bestehend aus den 10 Aminosäuren Ser-Ala-Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly bindet der StrepTagI hochaffin an Streptavidin und ermöglicht somit eine affinitätschromatographische Reinigung. Mit dem Vektor pASK75 (Anhang) ist nach der Expression auch ein Transport des Proteins ins Periplasma, durch Klonierung der kodierenden Sequenzen hinter die auf pASK75 kodierte OmpA-Signalsequenz (ssOmpA), möglich. Diese Strategie der Proteinsekretion empfiehlt sich sowohl für die funktionelle Produktion von rekombinanten Proteinen mit strukturellen Disulfidbrücken, als auch für zelltoxische Proteine. Werden rekombinante Proteine mit natürlichen Disulfidbrücken im Cytoplasma exprimiert, können sich die Disulfidbrücken wegen des reduzierenden Milieus nicht bilden, was zur Aggregation oder zum Abbau führen kann. Sofern keine Stop-Transfer-Sequenzen enthalten sind, lassen

sich auch cytosolische Proteine sekretieren. Da Stop-Transfer-Sequenzen jedoch oft schwer vorhersagbar sind, ist es vorteilhaft, beide Expressionsstrategien parallel zu verfolgen.

Die Expressionskassette steht beim Vektor pASK75 unter der Kontrolle der Promotor/Operator-Region des tetA-Resistenzgens (Skerra, 1994). Der tetA-Promotor besitzt eine dem lac-UV5-Promotor vergleichbare Stärke und wird durch Zugabe von nicht antibiotisch wirksamen Konzentrationen von Anhydrotetracyclin induziert. Die konstitutive Expression des ebenfalls auf pASK75 kodierten tet- Repressorgens gewährleistet die hohe Repression des Promotors in Abwesenheit des Induktors. Da der tetA-Promotor keinen weiteren zellulären Regulationsmechanismen unterliegt, besteht bei diesem Expressionssystem keine Einschränkung in der Wahl des Kulturmediums oder des *E. coli* Expressionsstammes. Es bieten sich auch hier Protease-defiziente Stämme wie z.B. *E. coli* BL21 an.

Zum Zeitpunkt der in diesem Kapitel beschriebenen Versuche lag die wt-Arrestinraumstruktur noch nicht vor, so daß unklar war, ob Arrestin eine Disulfidbrücke enthält. Die mit dem pASK-Vektor mögliche Sekretion ins Periplasma von *E. coli* bietet dort die für die Entstehung von Cysteinbrücken notwendige oxidierende Umgebung (Missiakas et al., 1994; Zapun et al., 1995).

### 3.1.3.1. Klonierung von Arrestin-StrepTagI in den Vektor pASK75

Die kodierende Sequenz des Arrestin Gens wurde mittels PCR unter Verwendung der PCR-Primer #3 und #4 (2.7.6.1.) amplifiziert. Als Template DNA diente hierbei der Vektor pBC-Arrestin (3.1.1.1.). Die Primer wurden so gewählt, daß eine Klonierung des PCR-Produktes im Leseraster der DNA-Sequenz für StrepTagI möglich war. Am 5'-Ende wurde die Restriktionsschnittstelle XbaI, und am 3'-Ende die Restriktionsschnittstelle Eco47III mit Hilfe der Primer eingeführt. Das ~1,2 kb PCR-Produkt wurde unter Verwendung des PCR-Script-Kits zwischenkloniert und anschließend sequenziert (Auftragssequenzierung, Fa. GATC). Die Randbereiche (jeweils ~400 bp) wurden durch die Sequenzierung verifiziert, im mittleren Bereich war ein Austausch mit wildtypischen Sequenzen erforderlich. Zunächst wurde das PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen XbaI und Eco47III aus dem Vektor pCRScript ausgeschnitten, und in den ebenso aufgeschnittenen und dephosphorylierten Vektor pASK75 ligiert (Konstrukt 44.4). Für den Austausch mit den wildtypischen Sequenzen wurde dieses Konstrukt mit NarI und NsiI geschnitten, wobei ~700 bp (inklusive des nicht-sequenzierten Bereiches) herausgeschnitten wurden. Der mit NarI und NsiI geschnittene Vektor 44.4 wurde mit einem wildtypischen ~700 bp NarI/NsiI-Fragment aus dem Vektor 32.1 ligiert (Konstrukt 59.7). Das Konstrukt 32.1 war zuvor durch Umklonierung des Arrestin Gens aus dem Vektor pQE-30 in den Vektor pUC18 unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen EcoRI und HindIII erzeugt worden.

### 3.1.3.2. Klonierung von ssOmpA-Arrestin-StrepTagI für Sekretion ins Periplasma

Unter Verwendung der PCR-Primer #4 und #5 (2.7.6.1.) wurde die kodierende Arrestinsequenz mittels PCR amplifiziert, wobei die Primer so gewählt wurden, daß eine Klonierung des PCR-Produktes im gleichen Leseraster mit der OmpA-Signalsequenz (ssOmpA) und der Sequenz für den StrepTagI möglich wurde. Am 5'-Ende wurde die Restriktionsschnittstelle EagI eingeführt und am 3'-Ende Eco47III. Als Template DNA diente der Vektor pBC-Arrestin (3.1.1.1.). Das ~1,2 kb PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR-Script (Anhang) zwischenkloniert und die Randbereiche durch Sequenzierung verifiziert (Auftragssequenzierung, Fa. GATC). Im mittleren Bereich war ein Austausch mit wildtypischen Sequenzen erforderlich. Zunächst wurde das PCR-Produkt über die Restriktionsschnittstellen EagI und Eco47III aus dem Vektor pCRScript ausgeschnitten, und in den mit BsaI (in diesem Fall kompatibel mit EagI) und Eco47III aufgeschnittenen und dephosphorylierten Vektor pASK75 ligiert (Konstrukt 45.4). Der Austausch nicht sequenzierter Bereiche wurde wie beim Konstrukt 44.4 beschrieben durchgeführt und resultierte im Konstrukt 60.7.

Die Vektoren 59.7 und 60.7 wurden durch Schneiden mit Restriktionsenzymen überprüft und zur Expression in den *E. coli* Stamm BL21::DE3 [plysS] transformiert (Klone 59.7 und 60.7).

### 3.1.3.3. Expression und Reinigung von Arrestin-StrepTagI

Die Kultivierung der Expressionskulturen (2.5.) erfolgte bei 30 °C und einer Induktionszeit von 3 h (Handbuch des Expressionssystems, Biometra). Die Kulturen des Klons 59.7 (ohne Signalsequenz) wuchsen zu einer OD<sub>600</sub> von ~2,5 heran, die des Klons 60.7 (mit ssOmpA) hatten am Ende der Expressionszeit die Zellzahl in etwa nur verdoppelt. Die Expression von Arrestin mit anschließender Sekretion ins Periplasma hemmt das Wachstum der Zellen entscheidend. Vorstellbar ist, daß durch Erkennung eines Stop-Transfer-Motifs innerhalb der Polypeptidkette von Arrestin das Protein in der Plasmamembran steckenbleibt.

Die Überexpression und Lokalisation von Arrestin-StrepTagI wurde in verschiedenen Zellkompartimenten und Fraktionen kontrolliert. Die periplasmatische Fraktion (2.5.2.), erster und zweiter Überstand, sowie das Pellet nach der zweiten Extraktion (2.5.) wurden mit SDS-PAGE (2.8.1.) und Westernblots (2.8.3.) analysiert:

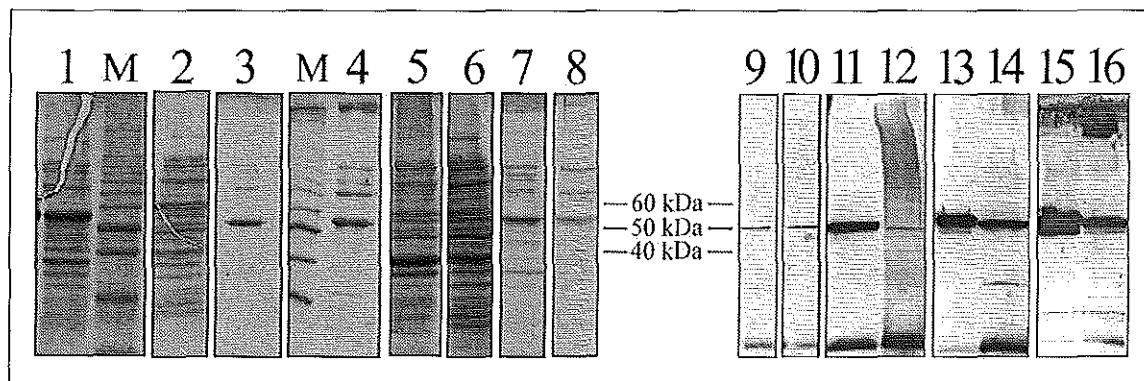
In beiden Konstrukten, d.h. unabhängig vom Vorhandensein der OmpA Signalsequenz läßt sich im Periplasma der Zellen nach Westernblotanalyse eine geringe Menge an Arrestin detektieren (Abb. 3.5. Spuren 9, 10). Dies ist durch geplatze Protoplasten bei der Herstellung der Periplasmafraktion zu erklären. Die OmpA Signalsequenz im Klon 60.7 bewirkte demnach keine Sekretion von Arrestin-StrepTagI ins Periplasma. Anzunehmen ist jedoch, daß ein Transport des exprimierten Proteins zumindest zum Teil stattgefunden hat, welcher

für die Zellen toxisch war. Sowohl im Cytoplasma (erster Überstand) als auch nach Reextraktion des Pellets (zweiter Überstand) lassen sich im Westernblot in beiden Klonen lösliche Anteile an Arrestin-StrepTagI finden (Abb. 3.5. Spuren 11, 12 und 13, 14), der Hauptteil bleibt jedoch im Pellet lokalisiert (Abb. 3.5 Spuren 15, 16). Das Coomassie gefärbte SDS-Gel zeigt (entsprechend zur MRGS-6His-Fusion, 3.1.2.) auf der Höhe von etwa 50 kDa in den Überständen (Klone 59.7 und 60.7) sowie dem Pellet des Klons 60.7 nur eine schwache Proteinbande (Abb. 3.5 Spuren 2, 5, 6), das Fusionsprotein läßt sich lediglich im Westernblot identifizieren (Abb. 3.5 Spuren 11, 12, 15).

Trotz der geringeren Zellmasse von Klon 60.7 (für Sekretion ins Periplasma) war nach Expression die absolute Menge an Arrestin-StrepTagI in den Zellen höher als in den Zellen des Klons 59.7 (vergleiche jeweils Spur 11 und 12, 13 und 14 sowie 15 und 16 in Abb. 3.5.).

Die Reinigung von Arrestin-StrepTagI aus den Überständen erfolgt mit den entsprechenden Puffern mittels Streptavidin-Sepharose (2.9., Tab. 2.6.). Aus erstem und zweitem Überstand konnte mittels Streptavidin-Sepharose Arrestin-StrepTagI gereinigt werden. Das eluierte Fusionsprotein war stark mit *E. coli* Proteinen verunreinigt (Abb. 3.5. Spuren 3, 7).

Nach Umpuffern und Konzentrieren der Eluatfraktionen zeigte sich auch hier die Instabilität des in *E. coli* exprimierten Proteins Arrestin. Ein Großteil des Proteins, vornehmlich jedoch beim Klon 60.7, fiel auf der Konzentratormembran aus. In den Spuren 4 und 8 der Abb. 3.5. sind konzentrierte Proben dargestellt. Im Vergleich zu den Eluaten läßt sich keine Konzentrierung erkennen, es sind äquivalente Volumina aufgetragen.



**Abbildung 3.5.:** Proben der Arrestin-StrepTag I Expression und Reinigung in Coomassie gefärbten 12%igen SDS Gelen (1-8) bzw. Westernblots nach Colorimetrischer Detektion über SA-AP Konjugat (9-16). In den Spuren M ist die 10kDa Ladder aufgetragen.

Proben des Klons 59.7 (Arrestin-StrepTagI):

1. Pellet; 2. Überstand 1; 3. Eluat 3; 4. konzentriertes Eluat;

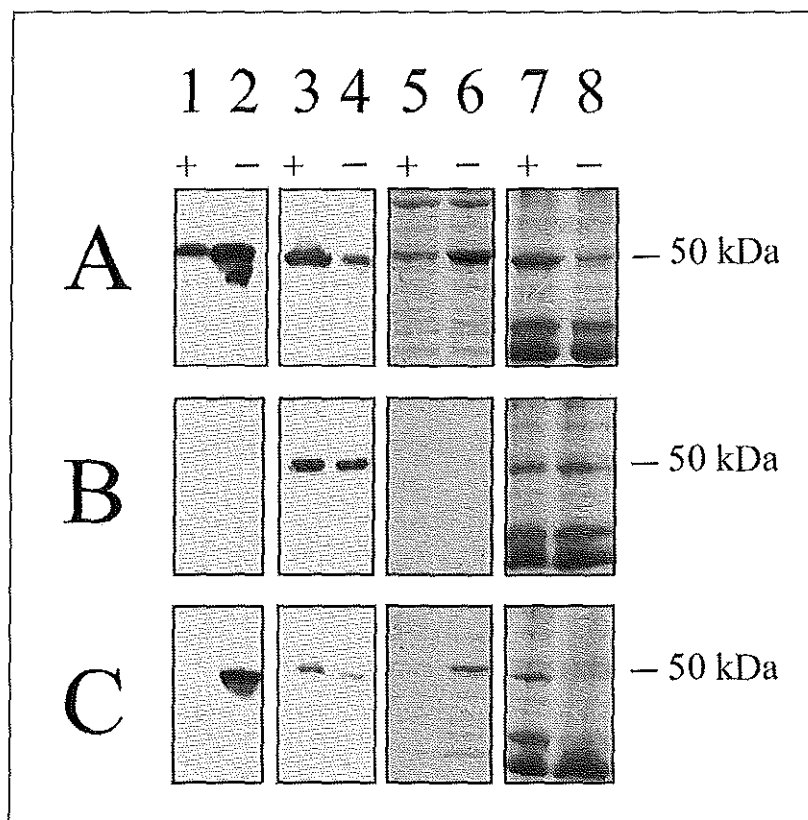
Proben des Klons 60.7 (ssOmpA-Arrestin-StrepTagI):

5. Pellet; 6. Überstand 1; 7. Eluat 3; 8. konzentriertes Eluat;

9. Periplasma; 11. Überstand 1; 13. Überstand 2; 15. Pellet

### 3.1.4. Zentrifugations-Bindungs-Assay zum Nachweis der Funktionalität von in *E. coli* exprimierten Arrestinen

Die aus den Klonen 59.7 und 26.3 gewonnene Arrestinlösung minderer Reinheit wurde im Zentrifugations-Bindungs-Assay (2.14.) eingesetzt. Mit diesem Assay wurde die Bindung von Arrestin an phosphoryliertes Rhodopsin in Abhängigkeit von der Belichtung bestimmt. Es wurden pro Ansatz ~100 nM Arrestin-StrepTagI bzw. MRGS-6His-Arrestin und ~20 µM PMBs in 100 µl Gesamtvolumen eingesetzt. Die Belichtung erfolgte 10 min auf einem Lichttisch. Der Test zeigt im SDS-Gel und Westernblot folgendes Ergebnis: Bei Belichtung läßt sich der Hauptteil des eingesetzten Arrestin-StrepTagI im Pellet lokalisieren (Abb. 3.6. Spuren A:1, 3, 5 und 7), im Dunkeln bleibt der größte Teil im Überstand (Abb. 3.6. Spuren A:2, 4, 6 und 8). Wenn man die im Pellet detektierbaren Mengen im Dunkeln und nach Belichtung vergleicht, so ist der Anteil, der nach Belichtung bindet größer als nach Dunkelinkubation.



**Abbildung 3.6.:** Bindungsverhalten von Arrestin-StrepTagI (Klon 59.7) und MRGS-6His-Arrestin (Klon 26.3) im Vergleich zum Arrestin aus dem Rinderauge an PMBs im Zentrifugations-Bindungs-Assay. Dargestellt sind Spuren aus Westernblots nach Chemolumineszenz-Detektion über polyklonale anti-Arrestin Antikörper (1-4) sowie Spuren von Coomassie gefärbten 12%igen SDS Gelen (5-8). 1., 5. Überstand nach Belichtung; 2., 6. Überstand im Dunkeln; 3., 7. PMB-Pellet nach Belichtung; 4., 8. PMB-Pellet im Dunkeln

A: Arrestin-StrepTagI (Klon 59.7); B: MRGS-6His-Arrestin (Klon 26.3); C: Arrestin aus dem Rinderauge

Für das MRGS-6His-Arrestin ergibt sich ein anderes Resultat. Unabhängig von der Belichtung ist das eingesetzte Protein vollständig im Pellet zu finden (Abb. 3.6. Spuren B: 3, 4, 7, 8) wobei der Überstand frei von Protein ist (Abb. 3.6. Spuren B: 1, 2, 5, 6).

Die Resultate dieses Aktivitätstests lassen sich folgendermaßen interpretieren: Arrestin-StrepTagI bindet wie das wildtypische Arrestin (Abb. 3.6. Spuren C) nach Belichtung an phosphoryliertes, und lichtaktiviertes Rhodopsin. Die beobachtete Bindung im Dunkeln deutet auf zumindest teilweise unspezifische Bindung oder Präzipitation des Proteins hin. Das MRGS-6His-Arrestin ist vollständig präzipitiert oder unspezifisch an die Membranen gebunden.

Die Resultate zeigen, daß die Expression von teilweise aktivem Arrestin in *E. coli* möglich ist. Die Proteinausbeute ist jedoch gering, da der Hauptanteil unlöslich ist und in der Pelletfraktion verbleibt, bzw. während der chromatographischen Reinigung präzipitiert.

### 3.2. Überexpression von Arrestin in *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* eignet sich als eukaryotischer Expressionsorganismus, da die Hefe wie andere Eukaryoten im Gegensatz zu Bakterien z.B. typische Organellen und einen Sekretionsapparat besitzt. Als einzelliger Organismus hat sie eine vergleichbare Wachstumsrate mit der von Prokaryoten. So lassen sich Hefen einfach und in anspruchlosen Medien in großen Mengen kultivieren. Eine Vielzahl von molekularbiologischen und biochemischen Methoden sind für diesen Organismus verfügbar, wobei die Entwicklung von Plasmid-Vektor Systemen (Sikorski & Hieter, 1989; Silar & Thiele, 1991) und die Transformation mit exogener DNA (Meilhoc, 1990; Schiestl & Gietz, 1989) hervorzuheben sind.

In *S. cerevisiae* werden Expressionsraten erreicht, die vergleichbar mit den höchsten Expressionraten in *E. coli* sind. Die Expression im *S. cerevisiae*-System war für verschiedene Arten von Proteinen, wie lösliche cytoplasmatische Proteine, integrale Membranproteine und auch sekretorische Proteine erfolgreich (Valenzuela et al., 1982; Brake et al., 1984; Lang-Hinrichs et al., 1994; Mollaaghababa et al., 1996; Lanfermeijer et al., 1998; Dhanabal et al. 1999). Viele für die biologische Funktion eines Proteins essentielle post-translationale Modifikationen sind mit einem Hefe-Expressionssystem möglich. Die Prozessierung von cytoplasmatisch exprimierten Proteinen wie z.B. Acetylierung des N-Terminus nach Entfernung des N-terminalen Methionins ist möglich (Kendall et al., 1990). Der Verlust des Zielproteins durch Proteolyse stellt jedoch wie in jedem heterologen Expressionssystem eine große Hürde dar. In der Hefe gibt es eine große Anzahl von Proteasen die in verschiedenen Kompartimenten lokalisiert sind. Die verschiedenen Endo- und Exoproteinasen der Vakuole z.B. bekommen beim Zellaufschluß Kontakt zu den cytoplasmatischen Proteinen und somit dem heterologen Protein (Emr, 1990; Jones, 1991).

Für eine erfolgreiche heterologe Expression in Hefen sollte das Produkt stabil und (für die Hefe) nicht toxisch sein, sowie in ausreichender Menge produziert werden. Die Stabilität des Zielproteins kann von der Wachstumsphase der Zellen abhängen, da Proteasen erst in bestimmten Wachstumsphasen der Hefen induziert werden (Jones, 1983; Moehle et al., 1987). Es kann daher einen Zeitpunkt maximaler Konzentration des heterologen Proteins geben. Durch Entkopplung des Wachstums (Vermehrung der Biomasse) von der Expression können toxische Einflüsse und Beeinflussung des Wachstumsverhaltens durch das heterologe Protein vermindert werden. Eine solche Entkopplung ist durch regulierbare Transkriptionssysteme in Hefe gegeben. Die Regulation wird bei den meisten verwendeten Systemen durch die Kohlenstoffquelle vermittelt.

Die in dieser Arbeit benutzten Hefe-*E.coli* Shuttle-Vektoren basieren auf dem natürlichen 2-µm Plasmid der Hefe, das eine hohe Kopienzahl und somit eine stabile Propagierung vermittelt. Für die maximale Expression eines geklonten Gens in *S. cerevisiae* ist diese Art von Vektor optimal. (Rose & Broach, 1990; Futcher & Cox, 1984; Murray & Szostak, 1983).

Unter Wachstumsbedingungen die selektiv für das Plasmid sind, machen die Plasmid-tragenden Zellen ungefähr 60 % bis 95 % der Zellpopulation aus. Dies hängt speziell vom jeweiligen Plasmid und dem verwendeten Selektionsmarker ab (Jayaram et al., 1983; Murray & Szostak, 1983). Die Sequenz des in den Vektor klonierten Gens hat ebenfalls einen direkten Einfluß auf die Plasmidstabilität in der Zelle (Armstrong et al., 1989). Die Kopienzahl von, auf dem 2-µm Plasmid basierenden Standard-Vektoren, liegt unter Uracilmangel meist bei etwa 10 bis 40 Kopien pro Zelle. Das Markergen URA3 der Plasmide ist vornehmlich für die Selektion auf transformierte Zellen wichtig. Der für die Kopienzahl entscheidende Marker aber ist das mit verkürztem aber funktionalem Promotor nur gering exprimierte Allel von LEU2, leu2-d (Erhard & Hollenberg, 1983). Dieses bewirkt unter Leucinmangel eine Vermehrung des Plasmids auf bis zu 200 – 300 Kopien pro haploidem Genom. Die Stabilität des Vektors wird verbessert und eine erhöhte Expression erreicht (Futcher & Cox, 1984).

### 3.2.1. Allgemeine Beschreibung des Vektors pEG-KT

Zur Konstruktion dieses Vektors wurde unter anderem das GST-Gen aus *Schistosoma japonicum* in den Vektor pEMBLyexT7 (Baldari et al., 1987) kloniert, so daß GST-Fusionsproteine erzeugt werden können (Mitchell et al., 1993). Zur Abspaltung des Zielproteins vom N-terminalen GST-Anteil ist die Sequenz für eine Thrombinschnittstelle enthalten. Nach Abspaltung ist das Zielprotein lediglich N-terminal um 2 Aminosäuren verlängert (NH<sub>2</sub>-Gly-Ser). Das Fusionsgen (GST + kodierende Sequenz des Zielproteins) steht unter Kontrolle des CYC1 Promotors mit einer durch Galaktose induzierbaren „upstream activator sequence“ (GAL1-10UAS) (Guarente & Ptashne, 1981). Dieser Hybrid-Promotor wird durch die Hexose Galaktose aktiviert, jedoch durch Glukose katabolisch reprimiert (Giniger et al., 1985). Um eine schnelle Induktion dieses Promotors zu gewährleisten, darf die Kultivierung der Zellen vor Induktion daher nicht auf Glukose stattfinden.

Die Gene der Galaktose Verwertung werden in Abwesenheit von Glukose und in Anwesenheit von Galaktose induziert. Das Modell der Galaktose Regulation beinhaltet sowohl positive als auch negative Kontrollelemente. In Anwesenheit von Galaktose bindet der GAL4-Aktivator an seine Erkennungssequenz und aktiviert die Expression der Galaktose abbauenden Enzyme. Der GAL80-Repressor bindet in Abwesenheit von Galaktose an den C-Terminus des Aktivatorproteins GAL4. Dadurch kann der GAL4-Aktivator die Expression nicht aktivieren. Es findet eine „Maskierung“ der Aktivierungsdomäne des Aktivators unter reprimierenden Bedingungen statt (Hopper et al., 1978; Oshima, 1982; Johnston, 1987; Johnston et al., 1987).



### 3.2.1.1. Klonierung von Arrestin in den Vektor pEG-KT

Die kodierende Arrestin Sequenz wurde aus den Konstrukten 9.13 (Arrestin im Vektor pGEX-4T-1, 3.1.1.1.) und 26.3 (Arrestin im Vektor pQE30, 3.1.2.1.) in den Expressionsvektor pEG-KT (Anhang) umkloniert. Der Vektor 9.13 wurde zunächst partiell mit BamHI verdaut (3.1.1.1.) wobei das entstehende ~1 kb Fragment isoliert wurde. Der Vektor 26.3 wurde mit SalI verdaut und das entstehende ~800 kb Fragment isoliert.

Zuerst wurde das ~1 kb BamHI-Fragment in den mit BamHI aufgeschnittenen und dephosphorylierten Vektor pEG-KT ligiert und die Orientierung überprüft (Konstrukt 23.3). Dieses Konstrukt wurde nun mit dem Enzym SalI geschnitten, dephosphoryliert und mit dem ~800 bp Fragment aus dem Vektor 26.3 ligiert (Konstrukt 30.3, durch Schneiden mit Restriktionsenzymen verifiziert).

Der Vektor 30.3 beinhaltet das Arrestin Gen von ~1,2 kb im gleichen Leseraster wie das GST-Gen zwischen den Restriktionsschnittstellen BamHI und SalI des Polylinkers im Vektor pEG-KT. Zur Expression wurde der Vektor 30.3 in den Stamm F11 transformiert (Klon 30.3, GST-Arrestin).

### 3.2.2. Allgemeine Beschreibung des Vektors pYEX-BX

Der Expressionsvektor pYEX-BX (Anhang) basiert auf dem Plasmid pYEULC (Macreadie et al., 1991) und wurde für "high-level" Expression von nativen Proteinen in Hefe entwickelt. Der Cu<sup>2+</sup>-induzierbare CUP1 Promotor des Hefe Metallothionein Gens steuert die Expression des kodierten Proteins (Macreadie et al., 1989). Der CUP1-Promotor ist nicht durch den Kohlenstoffstoffwechsel der Hefe beeinflusst und ermöglicht somit eine uneingeschränkte Wahl der Kohlenstoffquelle bei Zellanzucht und Induktion.

Die Interaktion von toxischen Metallionen mit biologischen Systemen beeinflusst sowohl das Zellwachstum, als auch den normalen Metabolismus. Redoxaktive Metallionen wie Cu<sup>2+</sup> sind toxisch, da sie mit Metaboliten wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder O<sub>2</sub> reagieren und dadurch freie Radikale erzeugen, die auf die Zelle oxidativen Streß ausüben. Kupfer ist aber gleichzeitig ein essentielles Element das als Cofaktor für viele Enzyme wie z.B. die Cytochrom-c-Oxidase dient (Thiele, 1992; Linder, 1991). Um sich vor den toxischen Eigenschaften der Metallionen zu schützen produzieren Zellen Metallothioneine. In *S. cerevisiae* gibt es das Metallothioneingen CUP1 (Hamer, 1986), dessen Regulation durch Kupfer- und Silberionen im Medium beeinflusst wird (Hamer et al., 1985). Die Kupfer-aktivierte Transkription des CUP1-Gens wird größtenteils durch die Aktion von einem Kupfer bindenden Transkriptions Aktivator Protein, ACE1 oder CUP2 genannt, reguliert (Szczypka & Thiele, 1989). Nach

einer Kupfer induzierten Strukturänderung ist ACE1 fähig, an die CUP1 "upstream activator sequence" (UASCUP1) zu binden, was die Transkription aktiviert (Furst et al., 1988; Evans et al., 1990).

#### **3.2.2.1. Konstruktion von MRGS-6His-Arrestin im Vektor pYEX-BX**

Die kodierende Arrestin Sequenz wurde aus dem Konstrukt 26.4 (Arrestin im Vektor pQE30, 3.1.2.1.) in den Expressionsvektor pYEX-BX umkloniert. Der Vektor 26.3 wurde hierzu mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII verdaut und die Einzelstrangüberhänge enzymatisch entfernt. Der Vektor pYEX-BX wurde mit PstI aufgeschnitten, die Einzelstrangüberhänge ebenfalls entfernt und das ~1,2 kb Fragment in den linearisierten, dephosphorylierten Vektor pYEX-BX ligiert. Die Orientierung wurde überprüft (Konstrukt 47.7). Im Konstrukt 47.7 stehen nun die kodierenden Sequenzen für MRGS-6His-Arrestin im Vektor pYEX-BX unter der Kontrolle des CUP1-Promotors. Zur Expression wurde der Vektor 47.7 in die Stämme F11 (Klon 47.7, MRGS-6His-Arrestin), YPH500, BJ2168, und BJ2407 transformiert.

#### **3.2.2.2. Konstruktion von Arrestin-6His im Vektor pYEX-BX**

Mit den PCR-Primern #6 und #12 (2.7.6.1.) wurde die kodierende Sequenz des Arrestin Gens durch PCR amplifiziert, als Template DNA diente das Konstrukt 9.13 (Arrestin im Vektor pGEX-4T-1, 3.1.1.1.). Mittels der PCR-Primer wurde am 5'Ende die Restriktionsschnittstelle EcoRI eingeführt. Am 3'Ende wurden die Sequenzen für das 6His-Peptid und eine EcoRI Schnittstelle angehängt. Das ~1,2 kb PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR-Blunt zwischenkloniert und durch Sequenzierung verifiziert (Konstrukt LPCR8.16). Die Umklonierung in den Expressionsvektor pYEX-BX erfolgte über die EcoRI Schnittstellen. Die Orientierung des Fragmentes wurde durch Schneiden mit Restriktionsenzymen überprüft (Konstrukt 73.2). Das Konstrukt 73.2 wurde zur Expression in den *S. cerevisiae* Stamm F11 transformiert (Klon 73.2, Arrestin-6His).

#### **3.2.2.3. Konstruktion von Arrestin-StrepTagII im Vektor pYEX-BX**

Die kodierende Sequenz des Arrestin Gens wurde mit den PCR-Primern #7 und #12 (2.7.6.1.) mittels PCR amplifiziert. Am 5'Ende wurde die Restriktionsschnittstelle EcoRI eingeführt,

und am 3'Ende die Sequenzen für den Strep-TagII und eine EcoRI Schnittstelle angehängt. Als Template DNA diente der Klon 9.13 (Arrestin im Vektor pGEX-4T-1, 3.1.1.1.). Das ~1,2 kb PCR-Produkt wurde im Vektor pCR-Blunt zwischenkloniert und durch Sequenzierung verifiziert (Konstrukt LPCR7.12). Die Umklonierung in den Expressionsvektor pYEX-BX erfolgte über die EcoRI Schnittstellen mit anschließender Überprüfung der Orientierung des Fragmentes durch Schneiden mit Restriktionsenzymen (Konstrukt 72.6). Das Konstrukt 72.6 wurde zur Expression in den *S. cerevisiae* Stamm F11 transformiert (Klon 72.6, Arrestin-StrepTagII).

#### 3.2.2.4. Konstruktion von Arrestin-GST im Vektor pYEX-BX

Die hier beschriebene Klonierungsstrategie ist im Anhang schematisch dargestellt. Die im Text angegebenen Nummern [1-10] beziehen sich auf diese Darstellung.

Die Fusionierung der kodierenden Sequenzen von Arrestin mit den GST-Sequenzen wurde mittels PCR (2.7.4., Strategie C) unter Verwendung des Vektors 9.13 (Arrestin im Vektor pGEX-4T-1, 3.1.1.1., [1]) als Template durchgeführt. Es wurden jeweils parallel die PCR-Primer #14 und #16 bzw. #15 und #17 (2.7.6.1.) kombiniert und die PCR-Produkte dieser Reaktionen [2] als Template der Folge-PCR zusammen mit den PCR-Primern #15 und #16 eingesetzt. Die Primer #14 und #17 wurden zueinander komplementär gewählt und dienten zur Einführung der Sequenzen für die Thrombinschnittstelle. Der Primer #15 befand sich im Bereich der XhoI Schnittstelle (bei ~750 bp) komplementär zur Arrestinsequenz. Am Ende von GST führte der Primer #16 eine EcoRI Restriktionsschnittstelle ein.

Das entstandene ~1,2 kb PCR Produkt wurde in den Vektor pCR-Blunt kloniert (Konstrukt LPCR 32.1) [3]. Nach Sequenzierung wurde dieser Vektor mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI geschnitten und das entstandene ~1,2 kb Fragment isoliert [3]. Parallel dazu wurde das Konstrukt LPCR8.16 (Arrestin-6His-Konstrukt in pCR-Blunt, [4]) mit den Enzymen EcoRI und SalI verdaut und das entstehende ~800 bp Arrestin-Fragment isoliert [4]. Dieses Fragment wurde anschließend in korrespondierende Schnittstellen des Vektors pUC18 ligiert (Konstrukt 98.24, [5]). Der Vektor 98.24 wurde nun mit XhoI und EcoRI verdaut, wobei ein ~500 bp Arrestin-Fragment ausgeschnitten wurde [5]. Im Austausch zu diesem ~500 bp Fragment wurde das aus dem Konstrukt LPCR32.1 gewonnene ~1,2 kb Fragment mit dem aufgeschnittenen Vektor 98.24 ligiert (Konstrukt 99.4, [6]). Der Vektor pUC18 enthält nun die Fusion der Gene von Arrestin und GST, wobei jedoch die ersten ~440 bp des Arrestins fehlen. Zur Überführung der Genfusion in den Expressionsvektor pYEX-BX wurde das ~1,5 kb große EcoRI/SalI-Fragment in entsprechende Schnittstellen des Vektors pYEX-BX ligiert (Konstrukt 100.1, [7]).

Für die Vervollständigung des Arrestin Gens wurden die im folgenden beschriebenen Schritte durchgeführt: Mit den Enzymen XbaI und XhoI wurde aus dem Konstrukt 73.2 (Arrestin-6His in pYEX-BX) ein ~1 kb Fragment isoliert [8]. Dabei schneidet XbaI im Vektor pYEX-BX und XhoI an bp750 des Arrestin Gens. Parallel dazu wurde das Konstrukt 100.1 ebenso geschnitten, wobei ein ~600 bp Fragment entsteht [9]. Im Austausch zu diesem ~600 bp Stück wurde das ~1 kb Fragment aus dem Vektor 73.2 mit dem Vektorfragment des Konstruktes 100.1 ligiert (Konstrukt 88.1, [10]).

Der entstandene Vektor 88.1 stellt das Endkonstrukt dar. Mittels PCR und verschiedenen Klonierungen wurde "downstream" an das Arrestin Gen das GST-Gen fusioniert. Die beiden Gene wurden über die Sequenzen für eine Thrombinschnittstelle miteinander verbunden. Zur Expression wurde der Vektor 88.1 in den Stamm F11 transformiert (Klon 88.1, Arrestin-GST).

### 3.2.3. Auswahl des *S. cerevisiae* Expressionsstammes sowie der Expressionsbedingungen

Zur Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen wurden die Parameter Expressionsstamm, Kulturmedium, Kohlenstoffquelle und Induktionsparameter variiert.

Die Wahl des Expressionsstammes hat Einfluß auf die heterologe Expression eines Proteins (Fleer, 1992; De Baetselier et al., 1991). Die Eignung eines Stamms wird u.a. durch den verwendeten Expressionsvektor und dessen Regulations-System bestimmt. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Vektoren verwendet, wobei entweder der GAL-CYC-Promotor oder der CUP1-Promotor enthalten ist (3.2.1, 3.2.2.). Es stehen verschiedene *S. cerevisiae* Stämme als Expressionswirt zur Verfügung, wobei alle die zur Plasmidselektion und -amplifikation benötigten Auxotrophien *ura3* und *leu2-d* besitzen (Genotypen der Stämme 2.4.3.).

Von besonderem Interesse war der Stamm F11, der die Eigenschaft haben soll, insbesondere auf Galaktose zu sehr hohen Zelldichten heranzuwachsen (F. Becker, pers. Mitteilung). Dieser Stamm wurde durch Ethylmethansulfonat Mutagenese aus dem Stamm SEY6210 (Wilsbach & Payne, 1993) erzeugt. Um das Wachstumsverhalten dieses Stammes mit einem YPH-Expressionsstamm (Stratagene) vergleichen zu können, wurde aufgrund des gleichen Paarungstyps der Stamm YPH500 gewählt, beide Stämme sind Mat  $\alpha$ .

Die aus dem YGSC (Yeast Genetics Stock Center, MCB/Biophysics and Cell Physiology University of California, Berkeley) bezogenen Stämme BJ2168 (Mat a) und BJ2407 (Mat a/ $\alpha$ ) sind aufgrund ihrer multiplen Proteasedefizienz von großem Interesse, um die Proteindegradation in der Zelle, besonders beim Zellaufschluß zu minimieren. Als

hauptsächlich aktive Protease nach Zellaufschluß ist *in vitro* die Endoprotease "Protease B" (PrB) der Vakuole anzusehen. Eine Eliminierung der PrB durch Mutation resultiert in der Stabilisierung vieler Proteine und kann die Ausbeute verschiedener Genprodukte entscheidend verbessern (Jones, 1990; Emr, 1990). Proteolytische *in vitro* Artefakte werden u.a. durch Hitze und SDS verstärkt, weil dadurch z.B. die PrB von ihrem Inhibitor befreit und somit aktiviert wird (Jones, 1990; Jones, 1991; Pringle, 1975; Ulane & Cabib, 1974). Somit kann sich z.B. auch das allgemeine Bandenmuster von Proteinextrakten im Coomassie gefärbten SDS-Gel ändern.

### 3.2.3.1. Wachstumsverhalten verschiedener *S. cerevisiae* Stämme in Abhängigkeit von Medium und Kohlenstoffquelle

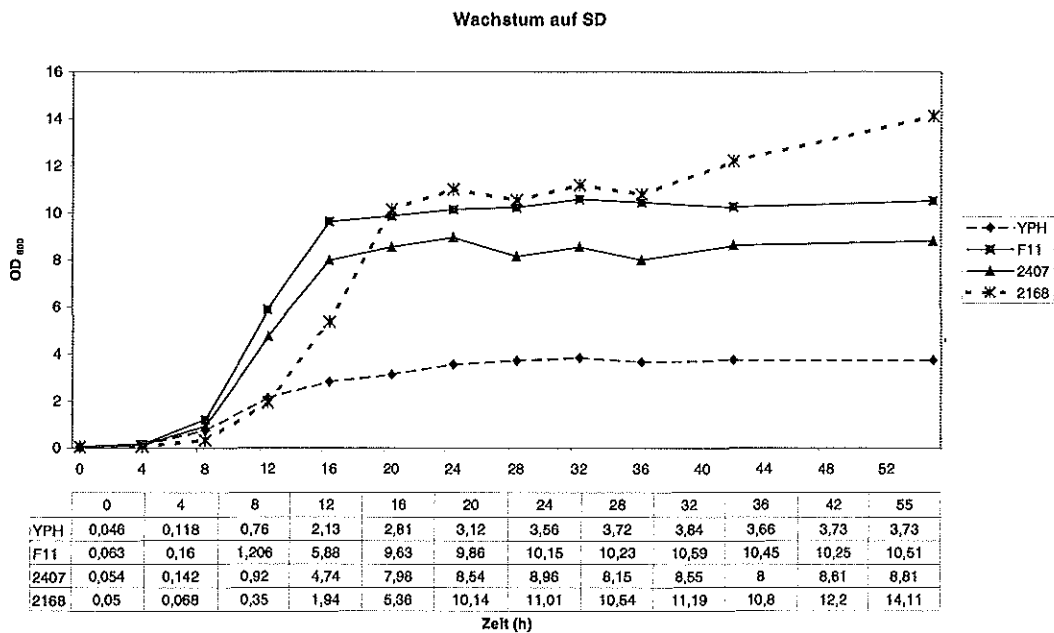
Die Induktion der heterologen Expression in einer Wachstumsphase mit hoher Zelldichte kombiniert den Vorteil der guten Verwertung der Medienbestandteile mit einer hohen Ausbeute an induzierbaren Zellen. Eine Expression in der stationären Wachstumsphase ist aber nachteilig, da insbesondere die verschiedenen Proteasen der Hefe (3.2.) beim Eintritt in die stationäre Phase mindestens 100fach vermehrt produziert werden (Moehe et al., 1987). Eine Induktion in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase scheint optimal, somit ist unter diesem Aspekt derjenige Wirtstamm der geeignetste, der möglichst spät und mit hoher Zelldichte die stationäre Phase erreicht.

Um die Eignung der beschriebenen Stämme für die Verwendung mit den Expressionsvektoren zu überprüfen (3.2.1., 3.2.2.), wurden Wachstumskurven unter variierenden Mediumsbedingungen aufgenommen. Die Kultivierung wurde wie unter 2.4.1. beschrieben durchgeführt und das Wachstum anhand der OD<sub>600</sub> in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt (2.4.2.). Es erfolgte eine doppelte Probenentnahme pro Kolben, der Mittelwert wurde für die Auswertung verwendet und ist dargestellt. Die Kulturen wurden mit einer OD<sub>600</sub> von jeweils etwa 0,05 gestartet und in folgenden Medien 55 h inkubiert:

YP mit: 2 % Glukose (YPD) oder 2 % Galaktose (YPG)  
 SC mit: 2 % Glukose (SD) oder 2 % Galaktose (SG)

Das Wachstum in Vollmedium war bei allen Stämmen unabhängig von der getesteten Kohlenstoffquelle sehr gut, es wurden nach 52 h eine OD<sub>600</sub> zwischen 10 und 25 erreicht. Somit sind für Expression in Vollmedium alle getesteten Stämme geeignet. Entscheidend für die Stammauswahl war aber das jeweilige Wachstum auf Minimalmedium, da die Expressionskulturen für Proteinreinigungen in Selektionsmedium ohne Leucin angezogen wurden (2.6.; 3.2.3.2.).

Die Abb. 3.7. zeigt das Wachstum der verschiedenen Stämme auf SD-Medium. Der Stamm YPH500 zeigt das für die Expression ungünstigste Wachstum unter diesen Bedingungen. Bereits beim Erreichen einer  $OD_{600}$  von 3,5 war die stationäre Phase erreicht, somit ist unter diesen Bedingungen keine große Biomasse erzeugbar. Der Vergleich der beiden Protease defizienten Stämme untereinander, zeigt eindeutig ein besseres Wachstum des haploiden Stammes BJ2168. Dieser Stamm erreicht bei einer  $OD_{600}$  von 11 die stationäre Phase. Der diploide Stamm BJ2407 war schon bei einer  $OD_{600}$  von 8,5 in der stationären Wachstumsphase.

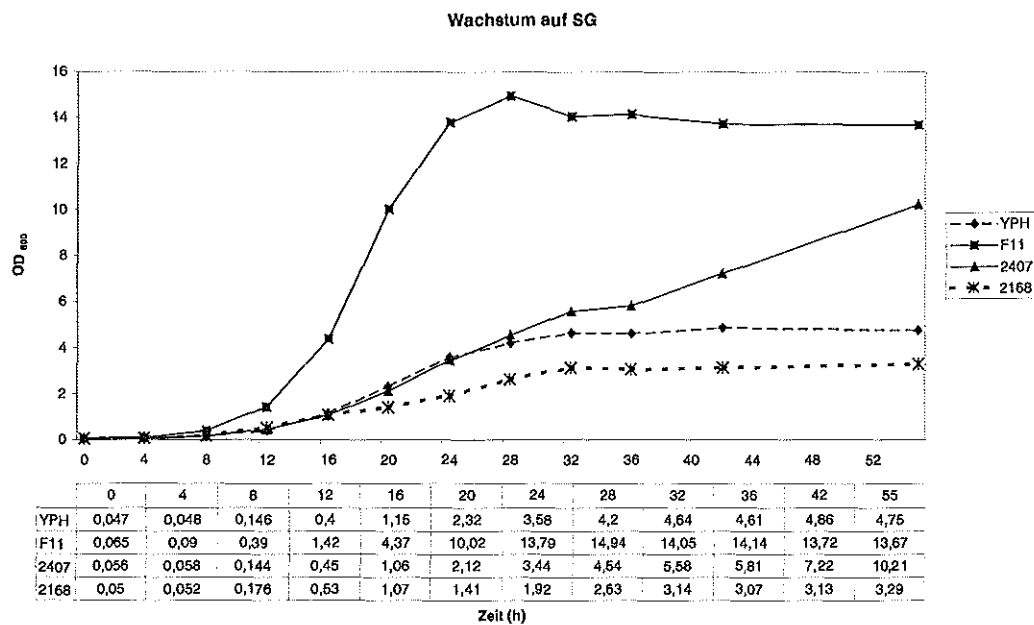


**Abbildung 3.7.:** Wachstum der verschiedenen Hefestämme auf SD-Minimalmedium. Tabellarisch dargestellt sind die aus Doppelbestimmungen gemittelten Meßwerte der  $OD_{600}$ . Graphisch ist die  $OD_{600}$  linear in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

Der Stamm F11 zeigte erwartungsgemäß (3.2.3.) das schnellste Wachstum auf SD Medium. Bereits nach 20 h war die stationäre Phase mit einer  $OD_{600}$  von 10 erreicht. Jedoch ist anzumerken, daß die Zellen des Stammes F11 bei Wachstum auf Glukose große Zellaggregate bilden, welche sich ohne Schütteln im Kolben sehr schnell absetzen. Anzunehmen ist, daß dadurch sowohl das Zellwachstum beeinflußt, als auch die  $OD_{600}$ -Messungen verfälscht werden. Die großen Zellaggregate gewährleisten unter Umständen keine ausreichende Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen. Dieser Faktor würde auch die heterologe Expression beeinflussen, z.B. dadurch, daß die induzierende Substanz nur schlecht oder gar nicht in die Zellaggregate eindringen kann. Somit wären in einer solchen Kultur nur ein Teil der Zellen induziert und zur Expression befähigt.

Für eine Kultivierung auf Glukose mit anschließender Expression eignen sich von ihren Wachstumseigenschaften nur die Protease defizienten Stämme. Sie liefern unter diesen Bedingungen eine ausreichende Biomasse.

Abb. 3.8. zeigt das Wachstum der beschriebenen Stämme auf SG-Medium. Es ist eindeutig zu erkennen, daß der Stamm F11 als einziger zu einer Zellmasse heranwächst, die für eine Expression geeignet ist. Die stationäre Phase war erst bei einer OD<sub>600</sub> von 13 erreicht. Die übrigen Stämme erreichten die stationäre Phase bereits bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 2 bis 4. Unter diesen Anzuchtbedingungen ist mit den Stämmen YPH500, BJ2168 und BJ2407 keine große Biomasse erzeugbar.



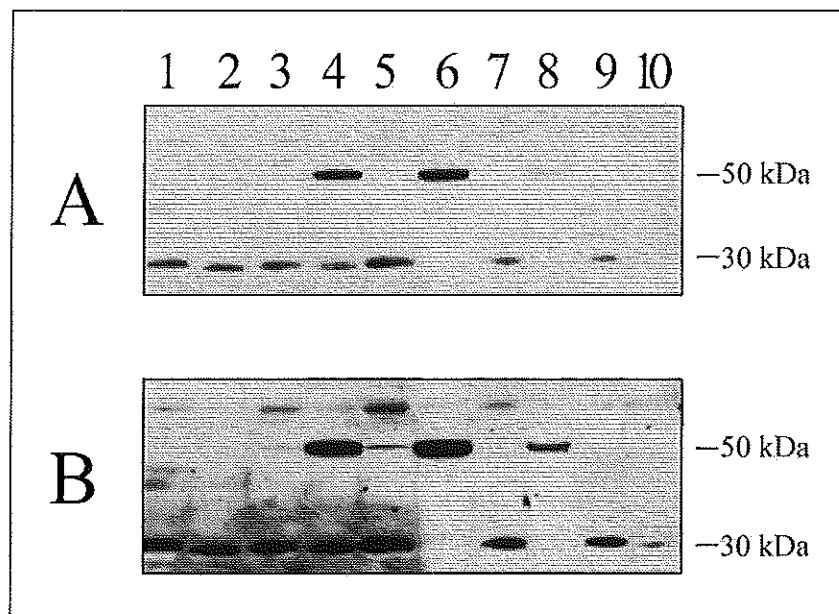
**Abbildung 3.8.:** Wachstum der verschiedenen Hefestämme auf SG-Minimalmedium. Tabellarisch dargestellt sind die aus Doppelbestimmungen gemittelten Meßwerte der OD<sub>600</sub>. Graphisch ist die OD<sub>600</sub> linear in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

Somit ergibt sich, daß Anzucht und Expression auf Minimalmedium mit Galaktose am sinnvollsten mit dem Stamm F11 ist. Bei Glukose als Kohlenstoffquelle ist dieser Stamm aufgrund der beschriebenen Eigenschaft der Zellaggregatbildung nicht geeignet. Bei Verwendung von Minimalmedium ist der Stamm YPH500 prinzipiell schlecht geeignet, dies ist unabhängig von der Kohlenstoffquelle. Anzunehmen ist, daß das frühe Eintreten in die stationäre Phase dieses Stammes durch seine Adenin-Auxotrophie bestimmt wird. Die Protease defizienten Stämme BJ2168 und BJ2407 sind ausschließlich für die Kultivierung auf Minimalmedium mit Glukose geeignet.

### 3.2.3.2. Vergleich der Arrestin-Expressionsraten in Vollmedium sowie unter Selektionsdruck in Minimalmedium

Die Stabilität und Kopienzahl des Vektors unter den gegebenen Anzuchtbedingungen ist für eine hohe Expressionsrate entscheidend. Vollmedium hat den Vorteil der Versorgung von Hefezellen mit allen Nährstoffen und somit die Garantie eines optimalen Wachstums. Minimalmedium ohne Uracil oder Leucin gewährleistet die Selektion auf Zellen mit Plasmid, bietet aber eine schlechtere Nährstoffversorgung.

Um die Eignung von Vollmedium für die Expression mit den Vektoren pYEX-BX und pEG-KT zu überprüfen, wurden Testexpressionen im kleinen Maßstab (5 ml) durchgeführt. Dabei wurden die Medien SC ohne Leucin und YP verglichen. Die Expression der Konstrukte 47.7 (MRGS-6His-Arrestin in pYEX-BX) und 30.3 (GST-Arrestin, pEG-KT) wurde in den Stämmen F11, YPH500, BJ2168 und BJ2407 überprüft. Die Stämme ohne Vektoren wurden als Negativkontrolle unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die Hauptkulturen wurden aus ÜN Vorkulturen auf eine OD<sub>600</sub> von etwa 1,5 angeimpft und nach einer Inkubation von 1 h induziert. Die Vorkulturen für die Expression der Konstrukte 47.7 wurden auf Glukose angezogen, die für die Expression der Konstrukte 30.3 auf Raffinose (3.2.1.). Nach Inkubation ÜN unter induzierenden Bedingungen wurden die Zellen geerntet und Gesamtzellextrakte (2.6.2.) hergestellt. Die Analyse der Proben erfolgte im Westernblot (2.8.3.). In Abb. 3.9. ist die Auswertung für das Konstrukt 47.7 dargestellt.



**Abbildung 3.9.:** Gesamtzellextrakte der Expression vom Konstrukt 47.7 (MRGS-6His-Arrestin) im Westernblot nach Inkubation mit dem polyklonalen anti-Arrestin Antikörper und entsprechendem Sekundärantikörper. Die Detektion erfolgte durch Chemolumineszenz. **A.** Filmexposition für 1 h; **B** Filmexposition ÜN; Expression auf Vollmedium (YP): Spuren 1, 3, 5, 7, 9; Expression auf Minimalmedium (SC): Spuren 2, 4, 6, 8, 10; 1., 2. Stamm F11 (Negativkontrolle); 3., 4. Stamm F11; 5., 6. Stamm YPH500; 7., 8. Stamm BJ2168; 9., 10. Stamm BJ2407



In fast allen Spuren detektierte der anti-Arrestin Antikörper im Molekulargewichtsbereich von etwa 30 kDa eine Bande. Diese ist jedoch auch bei der Negativkontrolle vorhanden (Abb. 3.7. Spuren 1, 2), so daß es sich um eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit Hefeprotein handeln muß.

Der Westernblot zeigt deutlich, daß nur auf Minimalmedium in den Stämmen YPH500 und F11 eine gut detektierbare Menge an rekombinantem Arrestin exprimiert wurde (Abb. 3.9. A, B Spuren 4, 6), wobei die Expressionsrate in F11 etwas höher zu sein schien. Bei längerer Exposition des Westernblots wird die Bande in Abb. 3.9. Spur 8 (SC beim Stamm BJ2168) eindeutig erkennbar, die Expressionsrate liegt aber weit unter der der Stämme YPH500 und F11. Bei Vollmedium läßt sich nur nach sehr langer Filmexposition des Blots eine Überexpressionsbande in den Stämmen F11 (Abb. 3.9. Spur 5), YPH500 (Abb. 3.9. Spur 3) und BJ2168 (Abb. 3.9. Spur 7) erkennen. Der Stamm BJ2407 zeigt unabhängig vom Medium keine detektierbare Expression (Abb. 3.9. Spuren 9, 10).

Aufgrund der hier dargestellten Resultate sind die Protease defizienten Stämme nicht für die Expression von Arrestin geeignet. Ebenso ungeeignet ist die Verwendung von Vollmedium. Der fehlende Selektionsdruck führt anscheinend zu einem fast vollständigen Verlust der Vektoren in der Zelle.

Um den Unterschied im Expressionslevel zwischen Selektion auf Uracil und Selektion auf Leucin zu ermitteln, wurden entsprechend den oben beschriebenen Versuchen Expressionskulturen angezogen. Die Auswertung erfolgte ebenfalls durch Westernblotanalyse von Gesamtzellextrakten (Daten nicht gezeigt).

Das Resultat dieser Untersuchung war, in Abhängigkeit vom Selektionsdruck, ein deutlicher Unterschied in der Menge an detektierbarem Protein im Westernblot. Unter Uracilmagel war die exprimierte Proteinmenge sehr gering, vergleichbar mit der nach Expression auf Vollmedium.

### 3.2.3.3. Ermittlung der Kupfertoleranz des *S. cerevisiae* Stammes F11

Die Induktion des CUP1 Promotors eines Vektors erfolgt immer in Abhängigkeit der Kupfertoleranz des verwendeten Expressionsstammes, da mit zu hohen Kupferkonzentrationen der Zellmetabolismus inhibiert wird. Zur Ermittlung der Kupfertoleranz des Stammes F11 wurden Zellen auf SC-Agarplatten mit 0,03 mM, 0,1 mM, 0,3 mM, 0,6 mM und 1 mM CuSO<sub>4</sub> ausplattiert. Es war keine Beeinflussung des Wachstums durch die verwendeten Kupferkonzentration festzustellen (Daten nicht gezeigt). Da die Kupfertoleranz eines Stammes bei Wachstum auf Agarplatte etwas größer bei Wachstum in Flüssigkultur ist, sollte die empfohlene Kupferkonzentration von 0,5 mM für den Vektor

pYEX-BX (Fa. Clontech) bei einer  $OD_{600}$  von 5 für die Zellen verträglich sein (Etcheverry, 1990).

**Tabelle 3.1.:**

Konstrukt/ Klon in F11	Kupferionen-Konzentration	End- $OD_{600}$
30.3, GST-Arrestin	-	4,99
47.7, MRGS-6His-Arrestin	0,5 mM	5,21
47.7, MRGS-6His-Arrestin	1,0 mM	2,94
47.7, MRGS-6His-Arrestin	2,5 mM	2,00
47.7, MRGS-6His-Arrestin	5,0 mM	1,96

Ergänzend wurden Wachstumsversuche des Klons 47.7 (MRGS-6His-Arrestin in F11) in Flüssigkultur (SG) unter ÜN-Induktion mit 0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM und 5 mM Kupfersulfat durchgeführt. Um eine Beeinflussung des Zellwachstums durch die Expression des Fremdproteins ausschließen zu können, wurden im Vergleich Zellen des Klons 30.3 (GST-Arrestin im Vektor pEG-KT) ÜN unter Galaktoseinduktion inkubiert. Die Kulturen wurden zu gleichen Zelldichten ( $OD_{600} = 0,1$ ) angeimpft. In Tabelle 3.1. ist die  $OD_{600}$  am Ende der ÜN Inkubationen gezeigt. Man erkennt deutlich, daß das Wachstum der Zellen durch 0,5 mM Kupfersulfat nicht beeinflusst wird, die End- $OD_{600}$  entspricht in etwa der End- $OD_{600}$  des Klons 30.3 (GST-Arrestin) ohne Kupferzugabe. Höhere Kupfersulfatmengen beeinflussen aber stark das Wachstum der Zellen.

Die Induktion des CUP1 Promotors erfolgt im Stamm F11 mit 0,5 mM Kupfersulfat.

### 3.2.3.4. Die optimierten Expressionsbedingungen

Zusätzliche Versuche, Daten nicht gezeigt, dienten der Optimierung der Zelldichte bei Induktionsbeginn sowie der Induktionsdauer.

Unter Berücksichtigung aller Experimente wurden folgende Bedingungen für Expressionkulturen im großen Maßstab gewählt:

<u>Verwendung von pEG-KT:</u>	Stamm F11 Zellanzucht auf 2 % Raffinose in SC ohne Leucin Induktion bei einer $OD_{600}$ von 5 mit 2 % Galaktose für 5 h
<u>Verwendung von pYEX-BX:</u>	Stamm F11 Zellanzucht auf 2 % Galaktose in SC ohne Leucin Induktion bei einer $OD_{600}$ von 5 mit 0,5 mM $CuSO_4$ für 5 h

### **3.3. Reinigung der verschiedenen in *S. cerevisiae* exprimierten Arrestin-Fusionsproteine**

Die Kultivierung von Expressionskulturen wurde nach optimierten Bedingungen durchgeführt (3.2.3.5.; 2.6.). Zellaufschluß und Herstellung von erstem und zweitem Überstand erfolgten im Puffer 10/400 unter Zusatz von Protease Inhibitoren, die genaue Beschreibung der einzelnen Reinigungsverfahren ist in Kapitel 2.9. zu finden.

#### **3.3.1. Zellaufschluß von *S. cerevisiae*: Einfluß verschiedener Methoden auf die Ausbeute an löslichem Protein**

Zellaufschluß mit Glasperlen nach Sphäroplastierung ist die Standardmethode für Hefezellen im Labormaßstab. Die für die Sphäroplastierung verwendete Zymolyase enthält jedoch verunreinigende Proteasen (Jones, 1991). Da Proteaseinhibitoren während der langen Inkubationszeit bei 30° C zur Sphäroplastierung ihre Wirkung verlieren, werden sie erst beim darauffolgenden Zellaufschluß mit Glasperlen zugesetzt.

Durch Westernblotanalyse von TCA-Gesamtzellextrakten (2.6.2.) wurde zunächst die erfolgreiche Expression von Arrestin in *S. cerevisiae* bestätigt. Um die Löslichkeit des exprimierten Proteins zu untersuchen, erfolgte die Analyse im Westernblot von löslicher und unlöslicher Fraktion nach Sphäroplastierung und Glasperlenaufschluß (2.6.1.). Arrestin befand sich bei diesen Versuchen jedoch stets nur im Pellet, im Überstand war kein exprimiertes Arrestin nachweisbar. Anzunehmen ist, daß während des Zellaufschlusses der Verlust des löslichen Arrestins durch Proteolyse erfolgte.

Die French-Press bietet den großen Vorteil des Zellaufschlusses bei Temperaturen von 0-4 °C, so daß eine Stabilität der zugesetzten Proteaseinhibitoren gewährleistet ist. Die Westernblotanalyse von löslicher und unlöslicher Fraktion nach Zellaufschluß mit der French-Press zeigte den Hauptanteil des exprimierten Arrestins im Überstand und nur einen geringen Anteil an Protein im Pellet (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigte die Expression von Arrestin in *S. cerevisiae* in löslicher Form. Da der Zellaufschluß nie vollständig ist (2.6.), wird die Menge an anscheinend unlöslichem, exprimierten Arrestin im Pellet auch durch den Zellaufschlußgrad bestimmt. Dies bedeutet, daß nicht aufgeschlossene Zellen die Pelletfraktion vergrößern. Außerdem scheinen die Zellen nach Kupferinduktion eine verstärkte Zellwand zu besitzen und lassen sich kaum sphäroplastieren und/oder mit Glasperlen aufschließen. Auch beim French-Press-Aufschluß wurde dieser Effekt im Vergleich zu Galaktose-induzierten Zellen beobachtet.

Die Art des Aufschlusses der Hefezellen hatte bei der Arrestinexpression einen starken Effekt auf die Ausbeute an löslichem Protein. Zum Zellaufschluß mit nachfolgender

Proteinreinigung wurde ausschließlich die French-Press verwendet, der Zusatz von Proteaseinhibitoren schon bei der Resuspendierung des gefrorenen Zellpellets war essentiell.

### **3.3.2. Reinigung von Arrestin mit Modifikationen am N-Terminus nach Expression in *S. cerevisiae***

#### **3.3.2.1. Reinigung von GST-Arrestin mittels GST-Glutathion-Affinitätschromatographie**

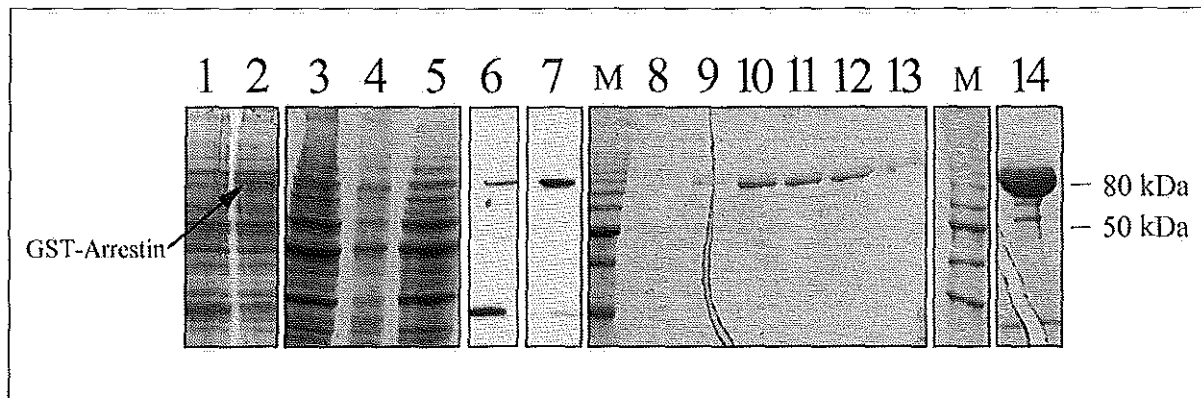
Im Coomassie gefärbten SDS-Gel (Abb. 3.10.) läßt sich das Fusionsprotein GST-Arrestin (~80 kDa) im Vergleich zum Gesamtzellextrakt von F11 Zellen nur mit dem Vektor pEG-KT im Gesamtzellextrakt erkennen (Abb. 3.10. Pfeil, Spuren 1, 2). Meist war aber in Gesamtzellextrakt, Pellet und Überstand keine Zuordnung der Banden auf der Höhe von ~80 kDa möglich (Abb. 3.10. Spuren 3-5). Der Westernblot bestätigte jedoch den Hauptteil des Fusionsproteins löslich im Überstand (Abb. 3.10. Spur 7). Die im Pellet erkennbare Menge kann, wie im Kapitel 3.3.1. diskutiert, durch nicht aufgeschlossene Zellen verursacht werden (Abb. 3.10. Spur 6).

Die Elution mit 30 mM reduziertem Glutathion resultierte in praktisch reinem Fusionsprotein (Eluat 1-6, Abb. 3.10. Spuren 8-13). Die Analyse von Säulenmaterial bestätigte eine vollständige Elution von der Matrix ohne Verluste von Fusionsprotein durch Präzipitation am Säulenmaterial. GST-Arrestin ließ sich durch Ultrafiltration ohne Präzipitatbildung konzentrieren (Abb. 3.10. Spur 14), über das Bradford-Verfahren wurde die Proteinmenge im Konzentrat bestimmt (2.8.4.1.).

Zum Erhalt reinen Arrestins wurde der GST-Anteil mit 10 U Thrombin pro mg Fusionsprotein (Herstellerangaben, Pharmacia) abgespalten. Um den Einfluß der Temperatur zu überprüfen, wurde ein Thrombinverdau-Ansatz geteilt und die resultierenden Aliquots parallel bei 4 °C und 18 °C jeweils für 4 h inkubiert.

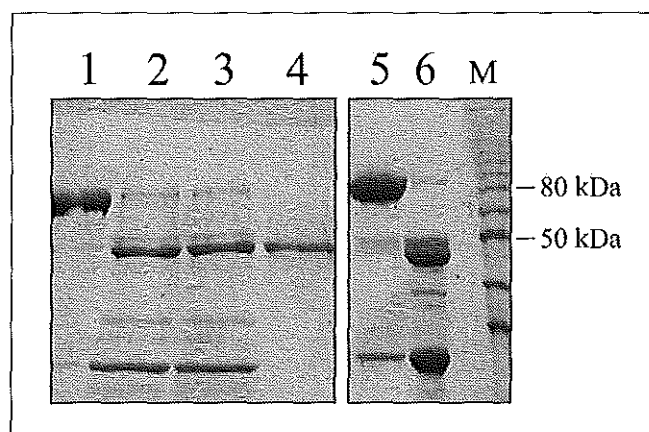
Die Resultate des Thrombinverdaus bei 4 °C (Abb. 3.11. Spur 2) und 18 °C (Abb. 3.11. Spur 3) zeigen, daß bereits bei 4 °C eine fast vollständige Spaltung des Fusionsproteins erfolgte. Prozessiertes und natives Arrestin aus dem Rinderauge (Abb. 3.11. Spur 4) weisen im SDS-Gel das gleiche Molekulargewicht auf. In Spur 1 der Abb. 3.11. wurde konzentriertes Fusionsprotein aufgetragen.

Die Isolierung des Arrestins aus dem Gemisch mit GST erfolgte mittels Affinitätschromatographie (2.9., Tab. 2.6.). GST und ungeschnittenes Fusionsprotein haben dabei an die Glutathion Sepharose gebunden, das Arrestin befand sich im Durchlauf (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.10.:** Gesamtzellextrakte, lösliche und unlösliche Fraktionen des Klon 30.3 (GST-Arrestin, Stamm F11), sowie Eluate von GST-Arrestin. Dargestellt sind Coomassie gefärbte 12%ige SDS Gele (Spuren 1-5, 8-14) und Western Blots (Spuren 6,7). Die Western Blots wurden mit polyklonalem anti-Arrestin Antikörper und entsprechendem Sekundäran antikörper inkubiert und mittels Chemolumineszenz detektiert. In den Spuren M ist die 10 kDa Ladder aufgetragen. 1. Negativkontrolle: Gesamtzellextrakt vom Stamm F11 mit Vektor pEG-KT; 2. Gesamtzellextrakt A (Klon 30.3); 3. Gesamtzellextrakt B (Klon 30.3); 4. Pelletfraktion nach erster Extraktion; 5 Überstand 1; 6. Pellet; 7. Überstand 1; 8.-13. Eluate 1-6; 14. Konzentrierte Eluate. Der Pfeil bezeichnet das Fusionsprotein GST-Arrestin.

Bei mehreren Versuchen traten Probleme bezüglich des Thrombinverdaus auf. Unter anderem konnte teilweise die Lagerung des Fusionsproteins bei 4 °C ohne Thrombinzugabe eine Spaltung in GST und Arrestin bewirken, wobei auch Degradationsbanden von Arrestin auftauchen (Abb. 3.11. Spuren 5, 6). Die Erklärung dafür wäre eine Proteaseaktivität (Thrombin) in den Eluaten. Problematisch zeigte sich zuweilen auch die abschließende Isolierung von Arrestin aus dem GST-Arrestin Gemisch mittels Affinitätschromatographie. GST und Fusionsprotein haben nicht quantitativ an das Säulenmaterial gebunden, auch wenn die Kapazität der Säule dabei nicht überschritten wurde (Daten nicht gezeigt).

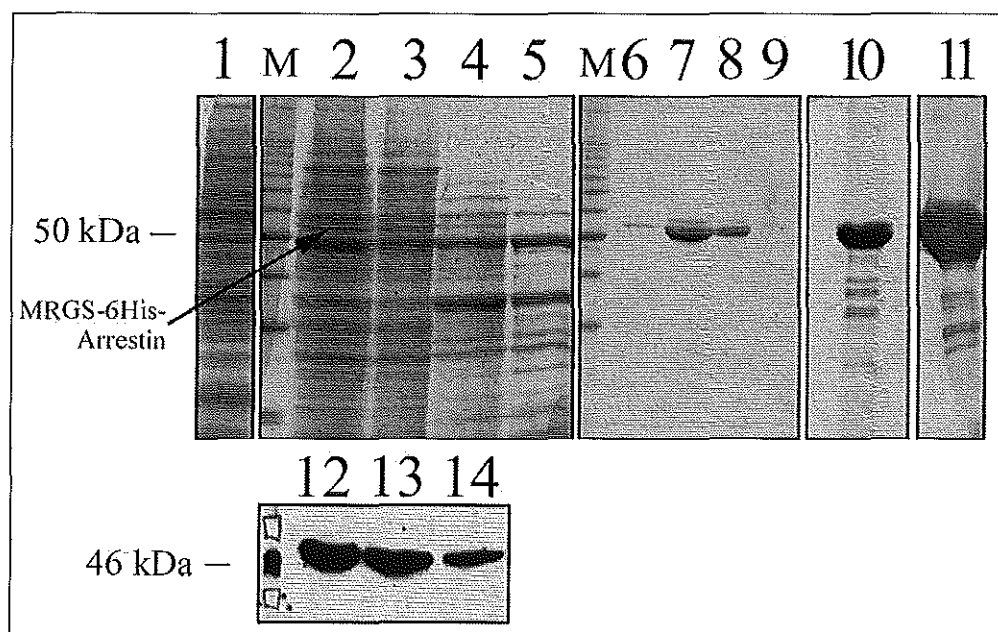


**Abbildung 3.11.:** Proben von GST-Arrestin in PBS in Coomassie gefärbten 12%igen SDS Gelen. In Spur M ist die 10 kDa Ladder aufgetragen. 1. konzentrierte Eluate, unverdaut; 2. Thrombinverdau-Ansatz bei 4°C, 4h; 3. Thrombinverdau-Ansatz bei 18°C, 4h; 4. Arrestin aus dem Rinderauge; 5. konzentriertes GST-Arrestin nach 1 Tag bei 4°C; 6. konzentriertes GST-Arrestin nach 10 Tagen bei 4°C

Abschließend läßt sich zusammenfassen, daß die Expression und Reinigung von GST-Arrestin in *S. cerevisiae* in löslichem Fusionsprotein resultiert, das aber in Lösung einer Proteolyse unterliegen kann, d.h. als Fusion nicht stabil ist. Die Isolierung von reinem Arrestin nach Spaltung mit Thrombin stellt sich in der Affinitätschromatographie problematisch dar und würde aufwendigere chromatographische Verfahren wie z. B. eine Gelfiltration erfordern.

### 3.3.2.2. Reinigung von MRGS-6His-Arrestin mittels IMAC

In diesem Konstrukt wurde das MRGS-6His-Peptid an den N-Terminus von Arrestin fusioniert. Diese Modifikation von Arrestin hat gegenüber der GST-Fusion den Vorteil, daß das Peptid nur aus 10 Aminosäuren besteht und seine Abtrennung nicht erforderlich ist (3.1.2.). Daraus resultiert eine Zeitersparnis bei der Reinigung sowie die Vermeidung von Verunreinigungen durch den abgetrennten Fusionspartner.



**Abbildung 3.12.:** Verschiedene Proben des Klon 47.7 (MRGS-6His-Arrestin in F11) nach Analyse in Coomassie gefärbten 12%igen SDS-GELEN (Spuren 1-11) oder WESTERNBLOT (Spuren 12-14). Die Detektion des Westernblots erfolgte über Chemolumineszenz nach Inkubation mit dem anti His-Peroxidase Konjugat. In den Spuren M ist die 10 kDa Ladder aufgetragen. 1. Gesamtzellextrakt von F11 Zellen mit dem Vektor pYEX-BX, Negativkontrolle; 2. Gesamtzellextrakt; 3. Pellet; 4. Überstände 1+2 gemischt; 5. Säulendurchfluß nach Aufgabe der Überstände; 6. – 9. Eluate 1-4; 10. Konzentrat der Eluate 1-4; 11. Konzentrat der Eluate einer parallelen Proteinreinigung. Der Pfeil bezeichnet das Fusionsprotein MRGS-6His-Arrestin.

Im Vergleich zu einem Gesamtzellextrakt von F11 Zellen nur mit dem Vektor pYEX-BX (Abb. 3.12. Spur 1) konnte man im Coomassie gefärbten SDS Gel beim Klon 47.7 im

Gesamtzellextrakt, Pellet und Überstand eine Bande bei etwa 50 kDa dem exprimierten 6His-Arrestin zuordnen (Abb. 3.12. Pfeil, Spuren 2-4). Die Analyse dieser Fraktionen im Westernblot bestätigte dies (Abb. 3.12. Spuren 12-14). Die Reextraktion des Pellets, das zum Teil nicht aufgeschlossene Zellen enthielt, zur Erzeugung des zweiten Überstandes war notwendig, um über genügend Ausgangsmaterial für die Reinigung zu verfügen.

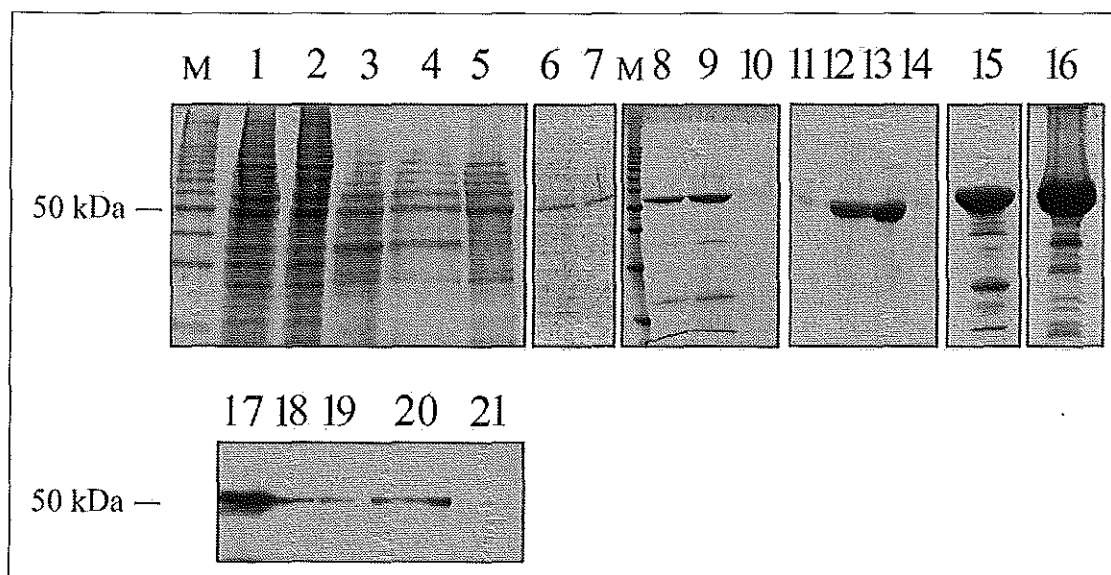
Das 6His-Arrestin eluierte in fast reiner Form in einem Gesamtvolumen von etwa 20 ml (2 Eluatfraktionen) von der Nickel-Chelat-Säule, lediglich eine schwache Bande oberhalb der Hauptbande ist in Abb. 3.12. Spuren 6-9 zu erkennen. Essentiell für die Reinheit des isolierten 6His-Arrestins war der zweite Waschschrift mit dem Puffer WB (2.9., Tab. 2.6.). Der Puffer enthielt 60 mM Imidazol, um kontaminierende Hefeproteine vom Säulenmaterial zu entfernen. Durch diesen Waschschrift trat ein erheblicher Verlust an rekombinantem Protein auf. Eine Reduktion auf 30 mM verringerte nicht den Verlust an 6His-Arrestin, die Proteinlösung war aber stärker mit Hefeproteinen kontaminiert (Daten nicht gezeigt). Nach Konzentrierung des Proteins wurden im SDS-Gel Banden von kontaminierenden Proteinen sichtbar, dargestellt sind konzentrierte Eluate von zwei verschiedenen Proteinpräparationen (Abb. 3.12. Spuren 10, 11).

### **3.3.3. Arrestin mit Modifikationen am C-Terminus**

#### **3.3.3.1. Reinigung von Arrestin-6His mittels IMAC**

Die Analyse von Gesamtzellextrakt im Coomassie gefärbten SDS Gel sowie löslicher und unlöslicher Fraktion des Klons 73.2 (Arrestin-6His in F11) erlaubte keine eindeutige Zuordnung einer Proteinbande bei etwa 50 kDa zum überexprimierten Arrestin-6His (Abb. 3.13. Spuren 1-4). Die Westernblot Analyse jedoch zeigte die Verteilung des Arrestin-6His Proteins in den genannten Fraktionen (Abb. 3.13. Spuren 17-21). Die in Abb. 3.13. Spur 17 im Pellet nach erster Extraktion dokumentierte Gesamtproteinmenge verteilte sich nach zweiter Extraktion zum Teil auch auf das Pellet (Abb. 3.13. Spur 18), der Hauptteil war in den löslichen Fraktionen Überstand 1 und Überstand 2 (Abb. 3.13. Spuren 19, 20) zu finden. Eine Analyse des Säulendurchflusses der Überstände im Westernblot (Abb. 3.13. Spur 21) belegte eine vollständige Bindung des eingesetzten löslichen Arrestin-6His an das Säulenmaterial. Wie schon bei der Reinigung des MRGS-6His-Arrestin beschrieben, trat auch bei diesem C-terminal modifizierten Arrestin ein nicht unerheblicher Verlust an rekombinantem Protein durch das Waschen der Säule mit Puffer WB auf. In Abb. 3.13. Spur 6 ist deutlich im Coomassie gefärbten SDS Gel eine Bande auf der Höhe von etwa 50 kDa bei Auftragung von 20 µl aus 500 ml Waschfraktion zu erkennen (1/25000 des Gesamtvolumens).

Die Eluate 1-4 von zwei unabhängigen Proteinpräparationen sind in der Abb. 3.13. in den Spuren 7-10 bzw. 11-14 gezeigt. Man erkennt, daß das Arrestin-6His jeweils in den Fraktionen 2 und 3 sehr sauber eluiert. Jedoch, wie die Abbildung zeigt, entweder als einfache Bande (Abb. 3.13. Spuren 8, 9) oder als Doppelbande (Abb. 3.13. Spuren 12, 13). Das Konzentrat der Eluate in Abb. 3.13. Spur 8, 9 ist in Spur 15 gezeigt, Spur 16 der Abb. 3.13. beinhaltet die in Spuren 12, 13 dargestellten Eluate einer anderen Präparation. Die dargestellten umgepufferten, konzentrierten Eluate wurden zur Kristallisation eingesetzt.



**Abbildung 3.13.:** Verschiedene Proben des Klons 73.2 (Arrestin-6His in F11) nach Analyse in Coomassie gefärbten 12%igen SDS Gelen (Spuren 1-16) bzw. Westernblot (Spuren 17-21). Die Detektion des Westernblots erfolgte über Chemolumineszenz nach Inkubation mit dem polyklonalen anti Arrestin Antikörper und entsprechendem Sekundärantikörper. In den Spuren M ist die 10kDa Ladder aufgetragen. SDS-GEL: 1. Gesamtzellextrakt; 2. Pellet nach zweiter Extraktion; 3. Überstand 1; 4. Überstand 2; 5. Säulendurchfluß der Überstände; 6. Waschfraktion mit Puffer WB; 7.-10. Eluate 1a-4a; 11.-14. Eluate 1b-4b; 15. Konzentrat der Eluate 1a-4a; 16. Konzentrat der Eluate 1b-4b; WESTERNBLOT: 17. Gesamtzellextrakt; 18. Pellet; 19. Überstand 1; 20. Überstand 2; 21. Säulendurchfluß der Überstände

### 3.3.3.2. Reinigung von Arrestin-StrepTagII über StrepTaktin-Sephrose

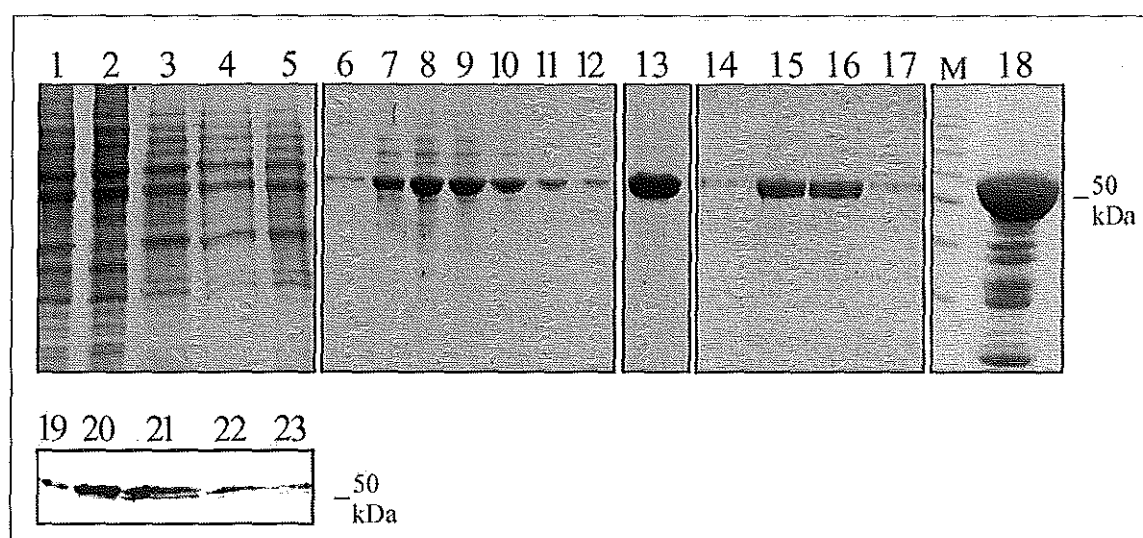
Bei Zellaufschluß und Reinigung ist ein Vorteil der Modifikation von Arrestin mit dem StrepTagII gegenüber dem 6His-Peptid, die Möglichkeit EDTA als Proteaseinhibitor verwenden zu können. In der Abb. 3.14. sind die Fraktionen eines Reinigungsverfahrens im Coomassie gefärbten SDS Gel sowie im Westernblot dokumentiert. Im SDS Gel ist keine Bande des Gesamtzellextraktes eindeutig dem exprimierten Protein zuzuordnen (Abb. 3.14. Spur 1). Auch die Analyse von Pellet (Abb. 3.14. Spur 2) und erstem (Abb. 3.14. Spur 3) sowie zweitem Überstand (Abb. 3.14. Spur 4) zeigt keine dominante Bande im Molekulargewichtsbereich von etwa 50 kDa. Der Westernblot mit colorimetrischer Detektion



über SA-AP Konjugat zeigt jedoch die Verteilung des exprimierten Proteins in den Fraktionen. In Gesamtzellextrakt (Abb. 3.14. Spur 19), Pellet (Abb. 3.14. Spur 20) sowie den Überständen (Abb. 3.14. Spuren 21, 22) ist Arrestin-StrepTagII als Doppelbande zu detektieren.

Im Gegensatz zu den affinitätschromatographischen Reinigungen von GST-Fusion oder 6His-Fusion zeigte der StrepTagII eine unzureichende Affinität zum Säulenmaterial. Dies wurde deutlich durch die Westernblotanalyse des Säulendurchflusses, Arrestin-StrepTagII ist in dieser Fraktion zu erkennen (Abb. 3.14. Spur 23).

Die Elution der Säule resultierte in löslichem Protein (Eluate 4-10, Abb. 3.14. Spuren 6 bis 12). Die Eluate enthalten, verglichen mit Eluaten nach IMAC, vermehrt kontaminierende Proteine, die zum Teil biotinierte Hefeproteine darstellen könnten. Beim Vergleich der Eluate mit ihrem Konzentrat (Abb. 3.14. Spur 13), sind die kontaminierenden Proteine im Konzentrat nicht mehr erkennbar. Dazu ist anzumerken, daß nach Ultrafiltration ein gelbliches Präzipitat auf der Konzentratormembran zu finden war.

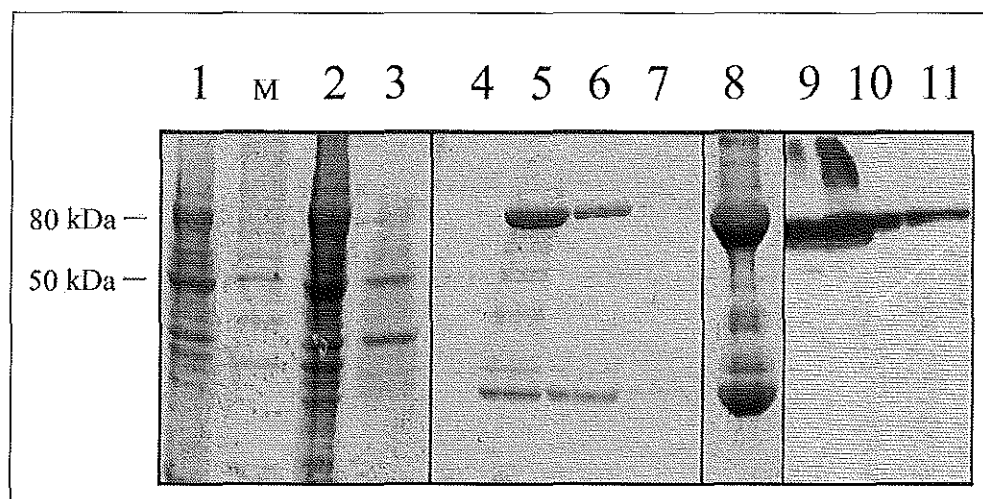


**Abbildung 3.14.:** Verschiedene Proben des Klons 72.6 (Arrestin-StrepTagII in F11) nach Analyse in Coomassie gefärbten 12%igen SDS Gelen (Spuren 1-18) oder Westernblot (Spuren 19-23). Die Detektion des Westernblots erfolgte über colorimetrische Detektion nach Inkubation mit SA-AP Konjugat. In der Spur M ist die 10kDa Ladder aufgetragen. SDS-GEL: 1. Gesamtzellextrakt; 2. Pellet nach zweiter Extraktion; 3. Überstand 1; 4. Überstand 2; 5. Säulendurchfluß nach Aufgabe der Überstände; 6.-12. Eluate 4.1-10.1; 13. Konzentrat der Eluate 4.1-10.1; 14.-17. Eluate 2.2-5.2; 18. Konzentrat der Eluate 2.2-5.2; WESTERNBLOT: 19. Gesamtzellextrakt; 20. Pellet nach zweiter Extraktion; 21. Überstand 1; 22. Überstand 2; 23. Säulendurchfluß nach Aufgabe der Überstände

Aufgrund der Detektion von Arrestin-StrepTagII im Säulendurchfluß wurde dieser erneut auf die regenerierte StrepTaktin Säule aufgetragen. Die Elution nach entsprechenden Waschschritten resultierte erneut in löslichem Arrestin-StrepTagII (Eluate 2-5, Abb. 3.14. Spuren 14 bis 17). Die umgepufferten und konzentrierten Eluate zeigt Abb. 3.14. Spur 18.

### 3.3.3.3. Reinigung von Arrestin-GST mittels GST-Glutathion-Affinitätschromatographie

Die untenstehende Abb. 3.15. zeigt den Verlauf einer Proteinreinigung aus Klon 88.1 (Arrestin-GST in F11) in SDS Gel und Westernblot. Der Vergleich von Gesamtzellextrakt (Abb. 3.15. Spuren 1, 9), Pelletfraktion (Spuren 2, 10) und erstem Überstand (Abb. 3.15. Spuren 3, 11) zeigte, daß nach der ersten Extraktion der Zellen noch ein erheblicher Anteil des Fusionsproteins im Pellet verblieb.



**Abbildung 3.15.:** Verschiedene Proben des Klons 88.1 (Arrestin-GST in F11) nach Analyse in Coomassie gefärbten 12%igen SDS Gelen (Spuren 1-8) oder Westernblot (Spuren 9-11). Die Detektion des Westernblots erfolgte über Chemolumineszenz nach Inkubation mit dem polyklonalen anti Arrestin Antikörper und entsprechendem Sekundärantikörper. In der Spur M ist die 10kDa Ladder aufgetragen. SDS-GEL: 1. Gesamtzellextrakt; 2. Pellet nach zweiter Extraktion; 3. Überstand 1; 4.-7. Eluate 1-4; 8. Konzentrat der Eluate 1-4; WESTERNBLOT: 9. Gesamtzellextrakt; 10. Pellet nach zweiter Extraktion; 11. Überstand 1

Der im Westernblot detektierbare Anteil an löslichem Arrestin-GST (Abb. 3.15. Spur 11) ist im SDS Gel nicht erkennbar (Abb. 3.15. Spur 3). Die Elution der Glutathion Sepharose resultierte in relativ sauberem, löslichem Protein (Abb. 3.15. Spuren 4-8). Die Elution erfolgte in den 20 ml der zweiten und dritten Eluatfraktion.

Im SDS Gel ist bei den Eluaten deutlich eine starke Bande von GST bei etwa 26 kDa zu erkennen. Es handelt sich nicht wie bei GST-Arrestin (3.2.4.2.) um gespaltenes Fusionsprotein, da keine Arrestinbande bei etwa 50 kDa vorhanden ist. Der polyklonale Arrestin Antikörper erkennt auf der Höhe von etwa 80 kDa das Fusionsprotein und nur sehr schwach weitere Banden (Abb. 3.15. Spuren 9-11). Entweder wurde trotz der dazwischenliegenden 1,2 kb der Arrestinsequenz das Start-ATG von GST erkannt und teilweise nur GST synthetisiert, oder der Arrestinanteil wurde vollständig proteolytisch entfernt. In Spur 8 der Abb. 3.14 ist das Konzentrat der Eluate 2 und 3 gezeigt. Das Fusionsprotein wurde in dieser Form im Zentrifugations-Bindungs-Assay eingesetzt.

### 3.3.4. Ausbeuten der verschiedenen Reinigungsverfahren

Die Zellausbeute der Expressionskulturen lag in etwa bei 1 g Zellen pro Liter Kultur bei einer OD<sub>600</sub> von 1. Durchschnittlich erfolgte die Zellernte nach Überexpression bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 6, so daß aus einem Liter Expressionskultur etwa 6 g Zellen gewonnen werden konnten. In der Tab. 3.2. sind die Proteinausbeuten der verschiedenen Arrestin-Derivate dargestellt.

Tabelle 3.2.:

Klon in F11	47.7	73.2	72.6	88.1	91.8	Ø
Protein	MRGS-6His-Arrestin	Arrestin-6His	Arrestin-StrepTagII	Arrestin-GST	Arrestin-V244C-6His	
P (g)	15,1	43,5	26,0	27,7	17,2	
Ü1 (mg/ml)	1,90	1,85	2,12	3,08	0,90	1,970
Ü1 (mg)	89,70	227,55	163,90	281,82	51,74	
Ü2 (mg/ml)	0,345	0,405	0,335	0,510	0,430	0,405
Ü2 (mg)	19,2	44,63	24,03	35,60	14,84	
T (mg)	108,9	272,0	187,9	317,4	66,5	
T (mg/g)	7,23	6,26	7,22	11,46	3,87	7,210
A (mg)	0,568	1,913	0,614	1,932	0,252	1,056
A (mg/g)	0,038	0,044	0,024	0,069	0,015	0,038
%	0,52	0,70	0,33	0,61	0,38	0,510
G (mg)	273,4	743,8	478,8	487,1	82,7	
G (mg/g)	18,1	17,1	18,4	17,6	[4,8]	17,800

P (g):	Gewicht Zellpellet	T (mg/ml) :	Gesamtmenge lösliches Protein pro g Zellen
Ü1 (mg/ml):	Proteinkonzentration Überstand 1	A (mg):	Ausbeute in mg Protein pro g Zellen
Ü1 (mg):	Proteinmenge in Überstand 1	A (mg/g):	Ausbeute in mg Protein pro g Zellen
Ü2 (mg/ml):	Proteinkonzentration Überstand 2	%:	Ausbeute in % von T (mg)
Ü2 (mg):	Proteinmenge in Überstand 2	G (mg):	Gesamtzellprotein
T (mg):	Gesamtmenge lösliches Protein	G (mg/ml):	Gesamtzellprotein pro g Zellen

Im Durchschnitt ließen sich etwa 40 µg gereinigtes und konzentriertes Protein pro Gramm Zellen (BFM) isolieren. Dies entspricht in etwa 0,5 % der gesamten löslichen Proteine in den Überständen. Die Menge an isoliertem Protein in den Eluaten vor Umpufferung und Konzentration wurde nicht ermittelt.

### 3.4. Arrestin Mutagenese

Ein Ziel dieser Arbeit ist, Erkenntnisse zum Bindungsmechanismus von Arrestin an Rhodopsin zu erlangen. Anhand der vorliegenden Röntgenstruktur ist es möglich, eine gezielte Mutagenese des wildtypischen Arrestins durchzuführen. Die räumliche Struktur von Arrestin besteht aus zwei kuppelförmigen Domänen verbunden durch einen flexiblen Bereich ("hinge region", Granzin et al., 1998; 1.5.). Es besteht die Annahme, daß die Bindung von Arrestin an Rhodopsin wahrscheinlich an der Innenseite einer der Kuppeln stattfindet (Granzin et al., 1998). Zur Überprüfung dieser Annahme soll durch kovalente Modifikation jeweils eine der beiden Kuppelinnenseiten blockiert werden um eine Bindung von Rhodopsin sterisch zu hindern. Anhand der dreidimensionalen Struktur wurden in jeder Domäne zwei Aminosäuren ausgewählt deren Seitenketten in die Kuppelwölbung hinausragen und keine Interaktion mit anderen Aminosäureseitenketten des Proteins eingehen. Diese wurden gentechnisch gegen Cysteine ausgetauscht. Die Cysteine wurden gewählt, da über deren Sulfhydrylgruppe eine kovalente Kopplung von z.B. Maleimidderivaten unter schonenden Bedingungen leicht möglich ist.

Die wildtypische Arrestin-Aminosäuresequenz weist allerdings drei freie Cysteine auf. Da nicht mit vollständiger Sicherheit eine Zugänglichkeit dieser Cysteine (Cys 63, Cys 128, und Cys 143) bei der Modifikationsreaktion ausgeschlossen werden kann, ist es sinnvoll, diese durch Aminosäuren ohne Sulfhydrylgruppe zu ersetzen. Mit Hilfe des Programms "Verify 3D" (Bowie et al., 1991) wurde unter Berücksichtigung der tatsächlichen Umgebung der drei Cysteine im Protein diejenige Aminosäure ermittelt, welche eine optimale Substitution an dieser Position in der Struktur darstellt. An allen drei Positionen ist eine Substitution mit der Aminosäure Serin optimal.

#### 3.4.1. Austausch der wildtypischen Cysteine von Arrestin gegen Serine

Die Mutagenese zum Austausch der Cysteine gegen Serine wurde mittels PCR unter Verwendung des Konstruktes 9.13 (3.1.1.1.) als Template durchgeführt. Es wurde die in 2.7.7. beschriebene Strategie B gewählt. Zunächst wurde der Mutageneseprimer #9 mit dem PCR-Primer #12 kombiniert und in einer Parallelreaktion der Mutageneseprimer #10 mit dem PCR-Primer #8 (2.7.6.1., 2.7.6.3.). Die Produkte dieser Reaktionen wurden als Primer in einer abschließenden PCR eingesetzt und das resultierende PCR-Produkt von ~1,2 kb unter Benutzung des Zero Blunt PCR Cloning Kits in den Vektor pCR-Blunt zwischenkloniert und durch Sequenzierung verifiziert (Konstrukt LPCRC-S.2).

### 3.4.2. Austausch von Aminosäuren in den Kuppeln von Arrestin: Zielgerichtete Mutagenese von Ser 60, Ser 169, Val 244 und Pro 352

In der N-terminalen Kuppel wurden die Aminosäuren Ser 60 bzw. Ser 169, in der C-terminalen Kuppel die Aminosäuren Val 244 bzw. Pro 352 gegen Cysteine ersetzt. Es wurden Arrestin-Mutanten mit jeweils nur einem Austausch erzeugt. Die Mutagenese erfolgte durch PCR mit der beschriebenen Strategie C (2.7.7.). Als Template diente die wildtypische Sequenz (Konstrukt 9.13, Arrestin im Vektor pGEX-4T-1, 3.1.1.1.) bzw. die Arrestin-C-S-Mutante (Konstrukt LPCRC-S.2, Arrestin-C-S in pCR-Blunt, 3.4.1.). Da unklar ist, ob die Substitution der natürlichen Cysteine die Aktivität von Arrestin beeinflusst, wurde die Mutagenese sowohl in der wildtypischen Arrestinsequenz als auch in der Arrestin-C-S-Sequenz durchgeführt

**Tabelle 3.3.:**

PCR A			PCR B	Konstrukt in pCR-Blunt	Konstrukt in pYEX-BX	Bezeichnung der Mutante
Mutagenese Primer	PCR-Primer	Template DNA	PCR-Primer			
#5	#6	9.13	#6, #12	42.11	94.11	Arr-S60C-6His
#11	#12	9.13				
#6	#6	9.13	#6, #12	41.6	89.20	Arr-S169C-6His
#12	#12	9.13				
#7	#12	9.13	#6, #12	43.5	91.8	Arr-V244C-6His
#13	#6	9.13				
#8	#12	9.13	#6, #12	44.24	92.3	Arr-P352C-6His
#14	#6	9.13				
#5	#6	LPCRC-S.2	#6, #12	49.1	90.16	Arr-C-S-S60C-6His
#11	#12	LPCRC-S.2				
#6	#6	LPCRC-S.2	#6, #12	50.19	93.5	Arr-C-S-S169C-6His
#12	#12	LPCRC-S.2				
#7	#12	LPCRC-S.2	#6, #12	51.1	95.16	Arr-C-S-V244C-6His
#13	#6	LPCRC-S.2				
		LPCRC-S.2	#6, #12	23.5	80.12	Arr-C-S-6His

Zunächst wurde jeweils ein Mutageneseprimer mit einem PCR-Primer in zwei parallelen PCR-Reaktionen A kombiniert. PCR-Reaktion B kombiniert die Randprimer (PCR-Primer) der vorangehenden Reaktionen, die PCR-Produkte der zwei PCR-Reaktionen A stellen gemeinsam das Template dar (2.7.7.). Die Kombination der verschiedenen Primer ist in

Tabelle 3.3. dargestellt. Das ~1,2 kb PCR-Endprodukt der PCR B wurde jeweils unter Benutzung des Zero Blunt PCR Cloning Kits in den Vektor pCR-Blunt zwischenkloniert und durch Sequenzierung verifiziert.

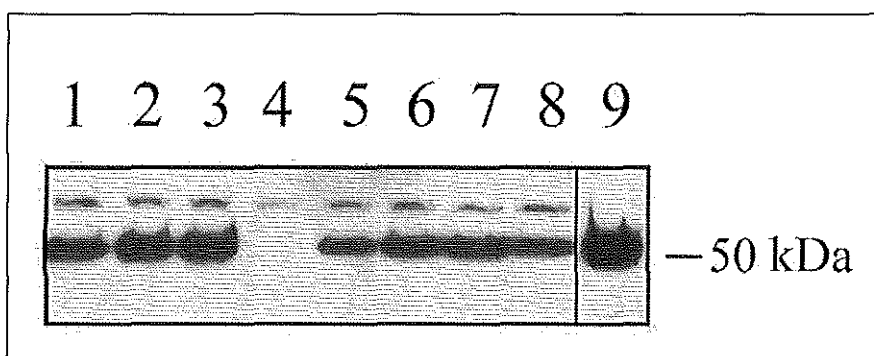
Die Umklonierung in den Expressionsvektor pYEX-BX erfolgte über die EcoRI Schnittstellen. Die Orientierung des jeweiligen Fragmentes wurde durch Restriktionsverdaus überprüft. In Tab. 3.3 sind die erstellten Konstrukte der Mutanten zusammengefaßt.

Zur Herstellung des Konstruktes 96.20 (Arr-C-S-P352C-6His in pYEX-BX) wurden die Vektoren 92.3 (Arr-P352C-6His in pYEX-BX) und LPCRC-S.2 (Arr-C-S in pCR-Blunt) mit BglII verdaut und das Vektorfragment des Konstruktes 92.3 zusätzlich dephosphoryliert. Das herausgeschnittene ~700 bp Fragment mit den wildtypischen Sequenzen aus 92.3 wurde gegen das entsprechende Stück aus dem Konstrukt LPCRC-S.2 der Cystein-Serin-Mutante ausgetauscht. Die Orientierung wurde durch Testverdaus überprüft.

Für die Expression wurden die Konstrukte in den Stamm F11 transformiert.

### 3.4.3. Expression und Reinigung von Arrestin Mutanten

Entsprechend der Expression und Reinigung von wildtypischem, mit 6 Histidinen modifiziertem, Arrestin (2.9., Tab. 2.6.) wurden verschiedene Mutanten exprimiert und gereinigt. Die Analyse von Totallysaten im Westernblot (Abb. 3.16.) bestätigte die Expression der Mutanten, mit Ausnahme des Konstruktes 92.3 (Arr-P352C-6His, Abb. 3.16. Spur 4). Das Konstrukt 92.3 wurde unter Verwendung der Sequenzierungsprimer #7 und #8 (2.7.6.2.) überprüft und die einklonierte Sequenz im Vektor pYEX-BX bestätigt. Es ist wahrscheinlich, das ein Defekt in der Promotorsequenz dieses Vektors vorliegt.



**Abbildung 3.16.:** Analyse von Gesamtzellextrakten verschiedener Konstrukte in F11 mittels Westernblots. Die Detektion erfolgte über Chemolumineszenz nach Inkubation mit dem polyklonalen anti Arrestin Antikörper und entsprechendem Sekundärantikörper. 1. Klon 89.20 (Arr-S169C-6His); 2. Klon 90.16 (Arr-C-S-S60C-6His); 3. Klon 91.8 (Arr-V244C-6His); 4. Klon 92.3 (Arr-P352C-6His); 5. Klon 93.5 (Arr-C-S-S169C-6His); 6. Klon 94.11 (Arr-S60C-6His); 7. Klon 95.16 (Arr-C-S-V244C-6His); 8. Klon 96.20 (Arr-C-S-P352C-6His); 9. Klon 80.12 (Arr-C-S-6His)

Bei Arrestin-C-S-6His (Klon 80.12 in F11) ließ sich mittels Affinitätschromatographie (IMAC) kein Protein aus der löslichen Fraktion reinigen (Daten nicht gezeigt). Es ist anzunehmen, daß der Austausch der Cysteine gegen Serine die Löslichkeit des Proteins beeinflusst. Die Proteine Arrestin-S60C-6His und Arrestin-S169C-6His sind nach Zellaufschluß ebenfalls im Pellet lokalisiert. Mittels Affinitätschromatographie läßt sich kein Protein aus der löslichen Fraktion isolieren.

Die einzige lösliche Mutante die sich mittels IMAC isolieren ließ, ist das Arrestin-V244C-6His. Der Austausch des Valins an Position 244 in Arrestin scheint dessen Struktur und Eigenschaften nicht so stark zu beeinflussen wie die Substitutionen der Serine an Position 60 bzw. 169. Arrestin-V244C-6His verhält sich während Reinigung, Umpufferung und Konzentration wie das wildtypische Arrestin-6His (Daten nicht gezeigt).

### **3.4.4. Expression der Spleißvariante von Arrestin p44 in *S. cerevisiae***

Im Gegensatz zum Arrestin (13 mg bis 26 mg aus 100 Retinae) läßt sich das Protein p44 in nur sehr geringen Mengen (70 µg bis 100 µg aus 100 Retinae) aus dem Rinderauge isolieren. Da p44 identisch mit den N-terminalen 369 Aminosäuren von Arrestin ist (zuzüglich eines C-terminalen Alanins) bestand eine große Wahrscheinlichkeit dieses Protein ebenso erfolgreich wie Arrestin in *S. cerevisiae* zu exprimieren.

Es wurden N-terminale Modifikationen mit 6His, 6His + Faktor Xa-Schnittstelle sowie StrepTagII erzeugt. Somit können verschiedene Reinigungsverfahren geprüft und das für p44 optimale ermittelt werden.

#### **3.4.4.1. Klonierung von p44-Konstrukten in den Vektor pYEX-BX**

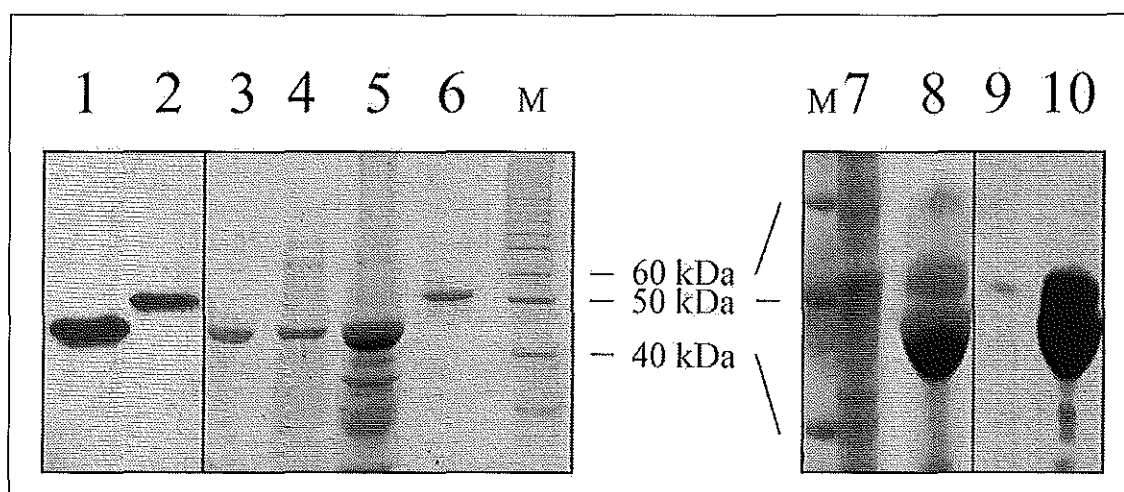
Es wurden die in 3.4.4. erwähnten Konstrukte von p44 mittels PCR erstellt. Am 5'-Ende wurden mit unterschiedlichen PCR Primern Sequenzen für modifizierende Peptide, Protease- und Restriktionsschnittstellen angehängt (Tab. 3.4.). Am 3'-Ende wurde stets der PCR Primer #9 verwendet, der das p44 Ende generiert und eine EcoRI Schnittstelle einfügt. Als Template DNA diente der Vektor 9.13 (Arrestin im Vektor pGEX-4T-1, 3.1.1.1.). Das ~1 kb PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR-Blunt zwischenkloniert und durch Sequenzierung verifiziert. Die Umklonierung in den Expressionsvektor pYEX-BX erfolgt über die EcoRI Schnittstellen. Die Orientierung des Fragmentes wurde durch Restriktionsverdaus überprüft. Zur Expression wurden die Konstrukte 70.8, 75.8 und 71.13 in den Stamm F11 transformiert, es resultierten die Klone 70.8, 75.8 und 71.13.

Tabelle 3.4.:

5' PCR-Primer	Angehängte Sequenzen für:	Konstrukt im Vektor pCR-Blunt	Konstrukt im Vektor pYEX-BX
#10	Strep-TagII, EcoRI	LPCR1.2	70.8
#11	6His-Tag, EcoRI	LPCR10.12	75.8
#13	6His-Tag-Xa, EcoRI	LPCR12.16	71.13

### 3.4.4.2. Expression und Reinigung von p44 aus *S. cerevisiae*

Die Expression und Reinigung der p44 Proteine erfolgte analog zu den Arrestin Derivaten (2.9., Tab. 2.6.). Die Expressionsraten der verschiedenen p44 Derivate im Stamm F11 waren vergleichbar mit denen von Arrestin. In Abb. 3.17. ist in Spur 1 das Totallysat von Klon 70.8 (StrepTagII-p44) im Vergleich zum Totallysat von Klon 72.6 (Arrestin-StrepTagII, Abb. 3.17. Spur 2) dargestellt. Die Westernblotanalyse von Totallysaten der Klone 71.13 (6His-Xa-p44) und 75.8 (6His-p44) im Vergleich zum Totallysat von Klon 73.2.(Arrestin-6His) sind im Kapitel 3.6.1. Abb. 3.23. dargestellt. Man erkennt die vergleichbaren Expressionsraten.



**Abbildung 3.17.:** Proteinproben im: 12%igen SDS Mini-Gel: 1. Gesamtzellextrakt Klon 70.8 (StrepTagII-p44); 2. Gesamtzellextrakt Klon 72.6 (Arrestin-StrepTagII); 3. StrepTagII-p44; 4. 6His-p44; 5. 6His-Xa-p44; 6. Arrestin aus dem Rinderauge; 12%igen großen SDS Gel: 7. Pelletfraktion 70.8 (StrepTagII-p44) nach Extraktion mit Phosphatpuffer; 8. Konzentriertes Strep-p44; Westernblot nach Inkubation mit dem Antikörper S8D8 und entsprechendem Sekundärantikörper: 9. Pelletfraktion 70.8 (StrepTagII-p44) nach Extraktion mit Phosphatpuffer; 10. Konzentriertes StrepTagII-p44. In den Spuren M ist die 10 kDa Ladder aufgetragen.

Die Ausbeute von löslichem Protein nach der Reinigung der verschiedenen p44 Derivate ist sehr gering. Nach Zellaufschluß verbleibt praktisch das gesamte Protein im Zellpellet



(Ergebnisse sind nicht gezeigt). In Abb. 3.17. sind die gereinigten und konzentrierten p44-Proteine im SDS Gel dargestellt. In Spur 3 ist StrepTagII-p44 aus Klon 70.8, in Spur 4 6His-p44 aus Klon 75.8 und in Spur 5 6His-Xa-p44 aus Klon 71.13 aufgetragen. Im Vergleich mit Arrestin aus dem Rinderauge (Abb. 3.17. Spur 6) ist der Größenunterschied von ~4 kDa gut zu erkennen, die p44-Derivate haben alle in etwa die gleiche Größe. Die in den Spuren 3 und 4 aufgetragenen Mengen entsprechen 1/16 (3 µl aus 50 µl) der isolierten Proteinmenge. Es lassen sich maximal 1/10 der Arrestinausbeute gewinnen (~3,5 µg Protein aus etwa 1 g Zellen).

Der fehlende C-Terminus scheint entscheidenden Einfluß auf die Löslichkeit des Proteins zu haben. Nach dem Hefe-Zellaufschluß mit Puffer 10/400 liegt der pH-Wert der Überstände bei etwa pH = 5,5. Die im Zellaufschlußpuffer enthaltene Puffersubstanz von 10 mM HEPES war nicht ausreichend um den pH Wert zu stabilisieren. Die Möglichkeit besteht, daß der auftretende "pH-Shift" beim Zellaufschluß zur Präzipitation von p44 führt (U. Eidhoff, pers. Mitteilung). Dies bedeutet, daß im Gegensatz zum Arrestin, das p44 sehr stark pH-empfindlich ist. Es wurde daher ein Zellpellet des Klons 70.8 (StrepTagII-p44) in Phosphatpuffer (200 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0) aufgeschlossen und anschließend entsprechend Kapitel 2.9, Tab. 2.6. das Protein gereinigt. Die Ausbeute an StrepTagII-p44 ist nun vergleichbar mit der Arrestin-StrepTagII Präparation. In Abb. 3.17. in den Spuren 7 und 9 ist die Pelletfraktion, in den Spuren 8 und 10 das p44-Konzentrat dargestellt. In der Westernblotanalyse ist nur ein geringer Teil von p44 im Pellet (Abb. 3.17. Spur 9). Das Konzentrat enthält kein sehr sauberes Protein, aber die gute Löslichkeit und Isolierbarkeit des exprimierten StrepTagII-p44 ist erwiesen. Entsprechende Resultate ergeben sich auch für das 6His-p44 aus dem Klon 75.8.

Durch Optimierung von Zellaufschluß und Reinigung ist es möglich p44 aus *S. cerevisiae* in ausreichenden Mengen für die Kristallisation zu gewinnen.

### **3.5. Zentrifugations-Bindungs-Assays zum Nachweis der Funktionalität von in *S. cerevisiae* exprimierten Arrestinen**

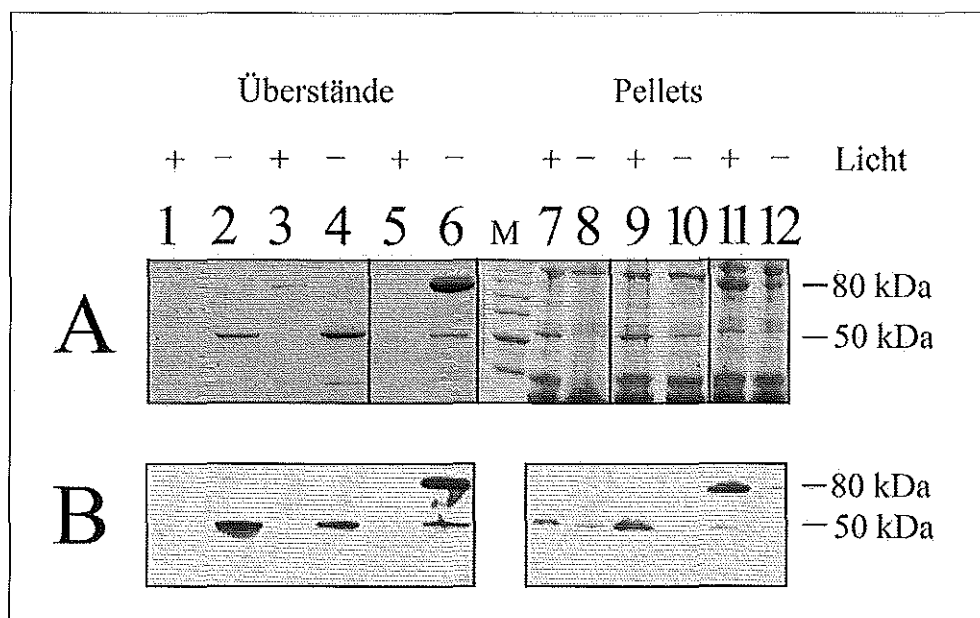
Die verschiedenen rekombinanten Arrestine wurden mit Hilfe des Zentrifugations-Bindungs-Assays auf Ihre Bindungseigenschaften und Spezifität überprüft.

Die Bedingungen der drei verschiedene Versuchsansätze variierten jeweils und sind explizit angegeben. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Westernblot, da insbesondere die Pelletproben aufgrund von kontaminierenden Proteinen aus PMBs und ROS im SDS-Gel schwer auszuwerten sind.

# I. Untersuchung der GST-Arrestin Fusion sowie aus GST-Arrestin isoliertes Arrestin im Vergleich zum Arrestin aus dem Rinderauge

Überprüft wurde hier nur die lichtabhängige Bindung der Arrestine an phosphoryliertes Rhodopsin (PMBs). Eingesetzt wurden pro Ansatz etwa 100 nM Arrestin bzw. GST-Arrestin und etwa 20  $\mu$ M PMBs in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l. Die Belichtung erfolgte für 10 min auf einem Lichttisch.

Nach Belichtung war das Arrestin aus dem Rinderauge im Pellet lokalisiert (Abb. 3.18. Spuren 7 A, B), im Überstand ließ sich kein ungebundenes Protein detektieren (Abb. 3.18. Spuren 1 A, B). Die gleichen Proben im Dunkeln inkubiert zeigten Arrestin im Überstand (Abb. 3.18. Spuren 2 A, B) und nur geringe Mengen bzw. überhaupt kein Protein im Pellet (Abb. 3.18. Spuren 8 A, B). Die entsprechende Verteilung auf Überstand und Pellet ist für das Fusionsprotein GST-Arrestin (Abb. 3.18. Spuren 5A, B; 6A, B; 11A, B; 12A, B) und für das aus GST-Arrestin isolierte Arrestin (Abb. 3.18. Spuren 3 A, B; 4A, B; 9A, B; 10A, B) zu finden. Im jeweiligen Pellet nach Inkubation im Dunkeln ließen sich durch die Westernblotanalyse geringe Mengen von Arrestin aus dem Rinderauge (Abb. 3.18. Spur 8B) und dem Fusionsprotein GST-Arrestin (Abb. 3.18. Spur 12B) detektieren. In den Spuren 6A, B und 11B der Abb. 3.18. ist eine geringe Menge Arrestin detektierbar (Banden bei etwa 50 kDa), da hier wahrscheinlich mit Thrombin kontaminiertes Fusionsprotein eingesetzt worden ist (3.3.2.1.).



**Abbildung 3.18.:** Resultate des Zentrifugations-Bindungs-Assays. Dargestellt sind Proben in Coomassie gefärbten 12%igen SDS-Gelen (A) und in Westernblots (B) nach Inkubation mit polyklonalem anti-Arrestin Antikörper und entsprechendem Sekundärantikörper mit abschließender Chemolumineszenz-Detektion. In der Spur M ist die 10 kDa Ladder aufgetragen. Arrestin aus dem Rinderauge: 1. Überstand nach Belichtung; 2. Überstand im Dunkeln; 7. Pellet nach Belichtung; 8. Pellet im Dunkeln; Arrestin aus GST-Arrestin: 3. Überstand nach Belichtung; 4. Überstand im Dunkeln; 9. Pellet nach Belichtung; 10. Pellet im Dunkeln; Arrestin-GST: 5. Überstand nach Belichtung; 6. Überstand im Dunkeln; 11. Pellet nach Belichtung; 12. Pellet im Dunkeln

Die Aktivitätstests zeigen eindeutig, daß sowohl das vom GST isolierte Arrestin als auch das Fusionsprotein aktiv sind. Beide Proteine verhalten sich unter den Bedingungen des Zentrifugations-Bindungs-Assay entsprechend dem Arrestin aus dem Rinderauge. Bindung an das phosphorylierte Rhodopsin erfolgte praktisch nur nach dessen Lichtaktivierung.

## II. Bindungs-Assay von MRGS-6His-Arrestin sowie Arrestin-6His im Vergleich zum Arrestin aus dem Rinderauge

Etwa 10 µg MRGS-6His-Arrestin bzw. Arrestin-6His wurden mit etwa 200 µg PMBs bzw. 120 µg ROS in einem Gesamtvolumen von 150 µl pro Ansatz eingesetzt. Die verwendete Menge an Arrestin aus dem Rinderauge betrug nur etwa 2,5 µg. Die Belichtung erfolgte für 20 min auf einem Lichttisch. Überprüft wurde die Abhängigkeit der Bindung an Rhodopsin von Phosphorylierung und Belichtung, dabei wurden PMBs und ROS (ungewaschen) eingesetzt.

### Auswertung der Ansätze mit Phosphorylierten Membranen (PMBs):

Die Analyse der PMB-Überstände im SDS-Gel (Abb. 3.19. Spuren 3A, 4A, 7A, 8A, 11A, 12A) zeigt sowohl für das MRGS-6His-Arrestin (Abb. 3.19. Spuren 7A, 8A) als auch das Arrestin-6His (Abb. 3.19. Spuren 3A, 4A) keine vollständige Bindung an die belichteten, phosphorylierten Membranen. Im Vergleich mit den Überständen nach Dunkelinkubation (Abb. 3.19. Spuren 4A, 8A) enthalten die Überstände nach Belichtung (Abb. 3.19. Spuren 3A, 7A) noch in etwa die Hälfte des eingesetzten Proteins. Das Arrestin aus dem Rinderauge war nach Belichtung nicht mehr im Überstand zu finden (Abb. 3.19. Spur 11A), jedoch wurde von diesem Protein auch nur ¼ der Menge der rekombinanten Arrestinfusionen eingesetzt. Nach Dunkelinkubation war das Arrestin aus dem Rinderauge ungebunden im Überstand (Abb. 3.19. Spur 12A). Zum Vergleich ist in Spur 1A der Abb. 3.19. der Überstand von reinen PMBs aufgetragen, es sind keine Banden zu erkennen.

Die PMB Pellets nach Belichtung oder Dunkelinkubation bestätigten das beschriebene Ergebnis. Im SDS Gel war die Auswertung schwierig aufgrund von kontaminierenden Banden aus der ROS-Präparation (Abb. 3.19. Spuren 3B, 4B, 7B, 8B, 11B, 12B). Im Vergleich zu den Pellets nach Dunkelinkubation (Abb. 3.19. Spuren 4B, 8B) erkennt man jeweils eine zusätzliche Bande bei etwa 50 kDa im Pellet nach Belichtung (Abb. 3.19. Spuren 3B, 7B). Die Pelletproben des Arrestins aus dem Rinderauge lassen sich im SDS-Gel nicht auswerten (Abb. 3.19. Spuren 11B, 12B).

Die Analyse der PMB Pellets im Westernblot (Abb. 3.19. Spuren 3C, 4C, 7C, 8C, 11C, 12C) war eindeutiger. Jedoch wurde auch hier die Auswertung durch das Vorhandensein von natürlichem Arrestin in den verwendeten Membranen erschwert. Der polyklonale Arrestin

Antikörper erkannte sowohl das natürliche retinale Arrestin als Doppelbande (3.7.), als auch das im Reaktionsansatz zugegebene rekombinante bzw. aus dem Auge isolierte Protein. Die Auswertung konnte jeweils nur durch Vergleich der belichteten Probe mit der Dunkelprobe erfolgen. Nach Belichtung ist ein stärkeres Signal (Abb. 3.19. Spuren 3C, 7C, 11C) als nach Dunkelinkubation zu erkennen (Abb. 3.19. Spuren 4C, 8C, 12C).

Erst die Westernblotanalyse mittels Detektion durch anti-6His-Konjugat lieferte ein eindeutiges Ergebnis. Nur in der Pelletprobe nach Belichtung (Abb. 3.19. Spur 3D) ist ein Signal zu detektieren. Es ist kein Signal in Abb. 3.19. Spur 4D, also fand nach Dunkelinkubation keine Bindung statt. Nur das Arrestin-6His kann in den Proben nachgewiesen werden (Abb. 3.19. Spuren 3D, 4D). Das Konjugat zeigte in diesem Versuch keine Reaktion mit den verschiedenen Pelletproben der Ansätze mit MRGS-6His Arrestin (Daten nicht gezeigt).

### **Auswertung der Ansätze mit ROS:**

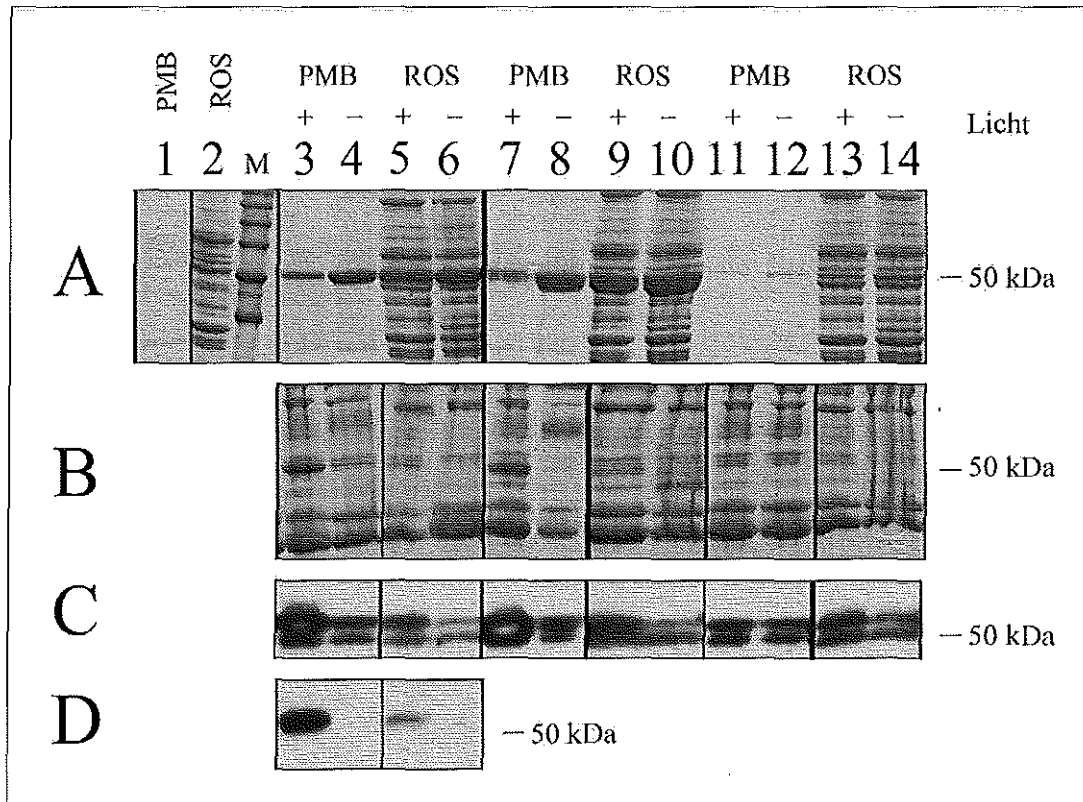
Im SDS Gel aufgetragene Überstände der verschiedenen Reaktionsansätze (Arrestin aus dem Rinderauge, MRGS-6His-Arrestin und Arrestin-6His) zeigen nur einen geringen Unterschied des Arrestin-Proteingehaltes nach Belichtung (Abb. 3.19. Spuren 5A, 9A, 13A) im Vergleich zur Dunkelinkubation (Abb. 3.19. Spuren 6A, 10A, 14A). Es hat nach Belichtung eine Bindung an die ROS Membranen in geringem Maße stattgefunden. Die Überstände der unbehandelten ROS enthalten eine große Zahl an löslichen Proteinen, daher ist zum Vergleich in Abb. 3.19. Spur 2A der Überstand von reinen ROS ohne Zusatz gezeigt. Die Pellets sind im SDS Gel nicht auswertbar (Abb. 3.19. Spuren 5B, 6B, 9B, 10B, 13B, 14B).

Die Westernblots der ROS Pellets bestätigten die beschriebenen Beobachtungen an den Fraktionen der Überstände. Nach Belichtung ließ sich ein stärkeres Signal detektieren (Abb. 3.19. Spuren 5C, 9C, 13C) als nach Dunkelinkubation (Abb. 3.19. Spuren 6C, 10C, 14C). Die Inkubation des Blots mit dem anti-6His-Konjugat wiederum bestätigte dies (Abb. 3.19. Spuren 5D, 6D).

In dieser Versuchsreihe II ergab sich eine Licht- und Phosphorylierungs abhängige Bindung von MRGS-6His-Arrestin und Arrestin-6His an Rhodopsin: Es wurde vornehmlich eine Bindung an lichtaktiviertes, phosphoryliertes Rhodopsin (PMBs) gefunden, nur in geringem Maße an ROS. Die Fusionsproteine verhalten sich unter den Bedingungen dieses Assay nicht anders als das Arrestin aus dem Rinderauge.

Ob tatsächlich eine Bindung an unphosphoryliertes Rhodopsin stattgefunden hat ist nicht definitiv zu folgern, da stets ein gewisser Anteil der Rhodopsinmoleküle in ROS phosphoryliert vorliegt. Auch kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die zum Test eingesetzten Arrestinmoleküle noch alle aktiv waren. Jedoch sollte im Falle einer Proteindenaturierung das Arrestin im Pellet zu finden sein. Es könnte sich daher um inaktives noch lösliches Arrestin handeln. Eine wahrscheinlichere Erklärung der beobachteten

Ergebnisse berücksichtigt die Belichtungsdauer und Intensität. Nur belichtete Rhodopsinmoleküle stehen als Bindungspartner zur Verfügung. Es könnte sein, daß die Anzahl der belichteten Rhodopsinmoleküle in diesen Versuchen nicht für die Bindung aller eingesetzter rekombinanten Arrestine ausreichte. Auch zerfällt der Arrestin-Rhodopsin-Komplex nach einiger Zeit wieder. Aufgrund langer Belichtung (20 min) konnten zu Anfang gebundene Arrestine wieder aus dem Komplex entlassen werden und somit ungebunden im Überstand vorhanden sein.



**Abbildung 3.19.:** Resultate des Zentrifugations-Bindungs-Assays von MRGS-6His-Arrestin (47.7) bzw. Arrestin-6His (73.2) im Vergleich zum Arrestin aus dem Rinderauge an PMBs und ROS. Dargestellt sind Proben in Coomassie gefärbten SDS-Gelen (12%) (A Überstände und B Pellets) und in Westernblots nach Chemolumineszenz-Detektion. Die Inkubation erfolgte mit polyklonalem anti-Arrestin Antikörper und entsprechendem Sekundärantikörper (C) oder mit anti-6His-Peroxidase Konjugat (D). In der Spur M ist die 10 kDa Ladder aufgetragen. Spur 1 zeigt den Überstand von PMBs ohne Zusatz von Arrestin, Spur 2 zeigt den Überstand von ROS ohne Zusatz von Arrestin.

Überstände nach Belichtung an PMBs:	Spur 3A 73.2, Spur 7 A, 47.7, Spur 11 A, bov. Arr.
Überstände nach Inkubation im Dunkeln an PMBs:	Spur 4 A 73.2, Spur 8 A, 47.7, Spur 12 A, bov. Arr.
Überstände nach Belichtung an ROS:	Spur 5 A 73.2, Spur 9 A, 47.7, Spur 13 A, bov. Arr.
Überstände nach Inkubation im Dunkeln an ROS:	Spur 6 A 73.2, Spur 10 A 47.7, Spur 14 A bov. Arr.
Pellets nach Belichtung an PMBs:	Spur 3B, C, D 73.2, Spur 7 B, C 47.7, Spur 11 B, C bov. Arr.
Pellets nach Inkubation im Dunkeln an PMBs:	Spur 4 B, C, D 73.2, Spur 8 B, C 47.7, Spur 12 B, C bov. Arr.
Pellets nach Belichtung an ROS:	Spur 5 B, C, D 73.2, Spur 9 B, C 47.7, Spur 13 B, C bov. Arr.
Pellets nach Inkubation im Dunkeln an ROS:	Spur 6 B, C, D, 73.2, Spur 10 B, C 47.7, Spur 14 B, C bov. Arr.

### **III. Untersuchung der verschiedenen N- und C-terminal modifizierten rekombinanten Arrestine im Vergleich zum Arrestin aus dem Rinderauge**

Basierend auf den bereits durchgeführten Bindungsassays (siehe I. und II.), sowie verschiedenen Experimenten mit Arrestin aus dem Rinderauge (Daten nicht gezeigt), wurden die folgenden Assays III. erstellt:

Parallel wurden zwei verschiedene PMB-Präparationen (PMBs-A und PMBs-N mit A = alt und N = neu) im Vergleich zu gewaschenen ROS (W-ROS) verwendet. Die Arrestinproben wurden 400 nM eingesetzt, die PMBs-A in 150fachem Überschuß (60 µM), PMBs-N und W-ROS in 75fachem Überschuß (30 µM) zugegeben. Das Volumen der Ansätze betrug 100 µl. Die Ansätze wurden entweder im Dunkeln inkubiert (Negativkontrollen) oder für 1 min bzw. 20 min mit einer starken Lichtquelle (400W) belichtet.

KCl-haltige Proben lassen sich schwer im SDS-Gel untersuchen, da beim Auftrag unlösliches Kaliumdodecylsulfat ausfällt. Um dies zu unterbinden wurden die in 120 mM KCl vorliegenden Membranen sedimentiert und für die Verwendung im Assay in NaCl-haltigen Bindungspuffer (2.3.1.) resuspendiert, die Proteinproben lagen im entsprechenden Puffer vor. Die gesamten Überstände (100 µl) und Pellets (1/10 Volumen bei PMBs-N und W-ROS, 1/5 Volumen bei PMBs-A) der Bindungsassays wurden in SDS-Gelen und Westernblots untersucht. Die Analyse der Überstände im SDS Gel mit Sypro-Orange Färbung und anschließendem Westernblot ist nicht gezeigt, da die Bandenintensitäten aller Überstände gleich waren.

Durch Reaktion des in den Membranen vorhandenen natürlichen Arrestins mit dem Antikörper wird (wie in II.) die Auswertung der Blots mit anti-Arrestin Antikörpern erschwert.

**A:** Der Vergleich der PMB Proben nach Dunkelinkubation mit den belichteten Proben zeigt ein stärkeres Signal nach Belichtung (Abb. 3.20. Spuren 1-6). Die Intensität der Signale der Westernblotanalyse der W-ROS Proben ist jedoch unabhängig von der Belichtung (Abb. 3.20. Spuren 7-9). Diese Versuchsreihe ergibt für Arrestin aus dem Rinderauge eine lichtabhängige Bindung an phosphoryliertes Rhodopsin, wobei aufgrund der Reaktion des in den Membranen vorhandenen, natürlichen Arrestins mit dem Antikörper keine Aussage über eine Bindung im Dunkeln getroffen werden kann. Eine Bindung an W-ROS findet sowohl im Dunkeln als auch nach Belichtung statt. Das Arrestin aus dem Rinderauge zeigt hier anscheinend Phosphorylierungs unabhängige Bindung.

**B:** Da das mit StrepTagII modifizierte Arrestin ein größeres Molekulargewicht als das native Arrestin aus dem Rinderauge hat, vereinfacht sich die Auswertung im Westernblot durch das Auftreten einer "dritten" Bande. Im wesentlichen liegt für Arrestin-StrepTagII das

gleiche Bindungsverhalten wie von Arrestin aus dem Rinderauge vor. An phosphoryliertes Rhodopsin (PMBs) findet eine lichtabhängige Bindung statt (Abb. 3.20. Spuren 1-6), wobei auch in den Dunkelproben (Abb. 3.20. Spuren 1, 4) deutlich eine schwache Bande detektiert wird. An W-ROS erfolgt unabhängig von der Belichtung eine deutliche Bindung.

**C:** An phosphoryliertes Rhodopsin (PMBs) bindet Arrestin-6His nur nach Belichtung, bei Dunkelinkubation ist in den Pellets im Westernblot keine Bande erkennbar (Abb. 3.20. Spuren 1-6). Die Bindung an die verwendeten W-ROS Membranen erfolgt Licht unabhängig, im Vergleich mit wildtypischen Arrestin aus dem Rinderauge und Arrestin-StrepTagII jedoch schwächer ausgeprägt (Abb. 3.20. Spuren 7-9). Das anti-6His-Konjugat wechselwirkt nicht mit Proteinen in W-ROS oder PMBs und ermöglicht eine eindeutige Aussage.

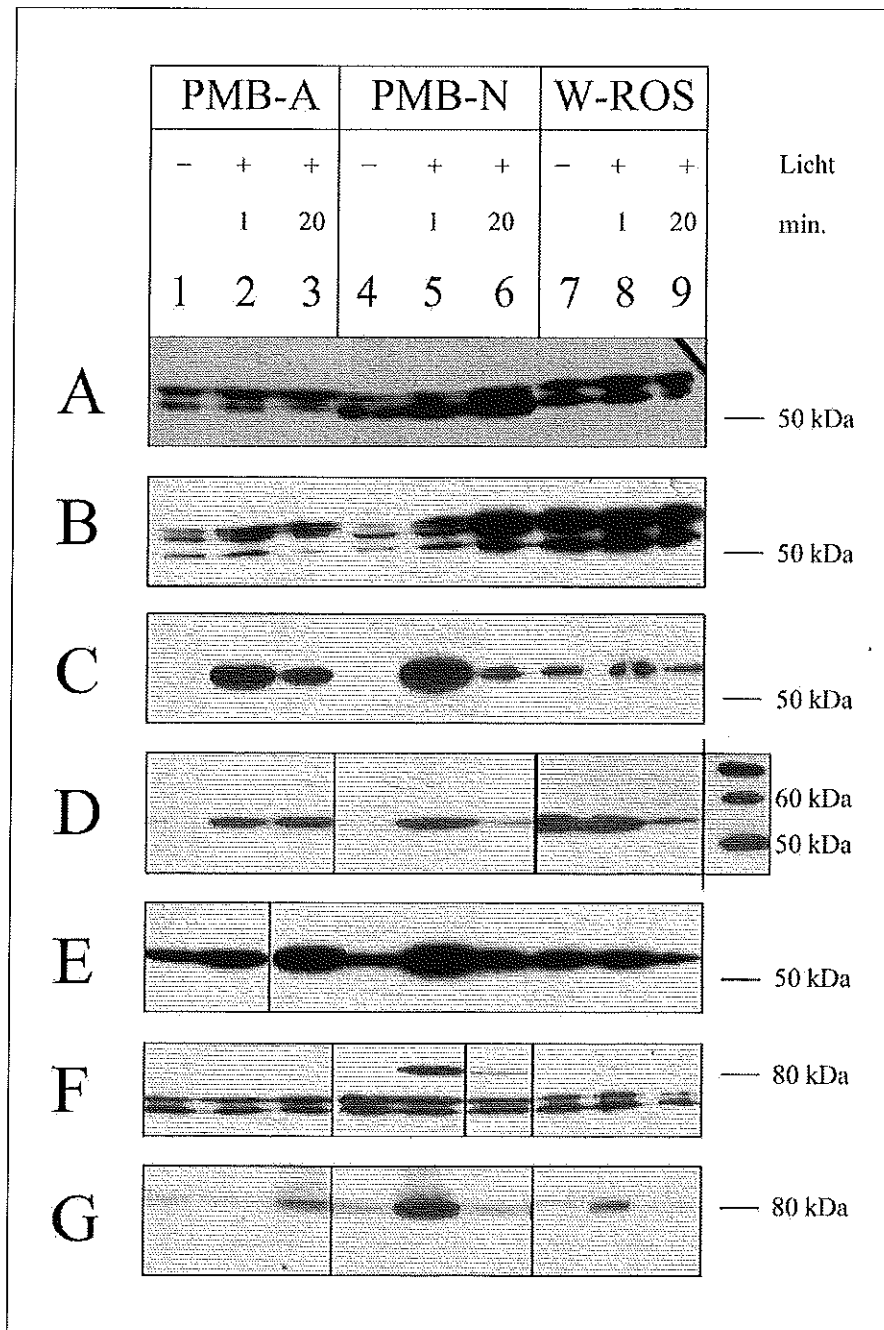
**D:** Arrestin-V244C-6His verhält sich wie ihr wildtypisches Pendant Arrestin-6His, und somit wie das Arrestin aus dem Rinderauge. In den Pellets der PMBs nach Dunkelinkubation ist nur eine sehr schwache Bande zu detektieren (Abb. 3.20. Spuren 1, 4). Die Proben nach Belichtung (Abb. 3.20. Spuren 2, 3, 5, 6) enthalten einen gut erkennbaren Anteil an gebundenem Arrestin-V244C-6His. Die Bindung an W-ROS erfolgt unabhängig von der Belichtung (Abb. 3.20. Spuren 7-9).

**E:** Das am N-Terminus mit MRGS-6His modifizierte Arrestin zeigt im Vergleich zu vorangegangenen Untersuchungen dieses Proteins (3.20.x. II) eine Bindung an Rhodopsin, die im wesentlichen nur schwach Licht- und Phosphorylierungs abhängig ist. Die Bindung an PMBs nach Dunkelinkubation (Abb. 3.20. Spuren 1, 4) entspricht in etwa der an das unphosphorylierte Rhodopsin (Abb. 3.20. Spuren 7-9). In den Pellets der belichteten Proben (Abb. 3.20. Spuren 2, 3, 5, 6) ist jedoch mehr MRGS-6His-Arrestin gebunden worden als nach Dunkelinkubation.

**F:** Nach Inkubation mit dem Antikörper S8D8 läßt sich kein gebundenes Fusionsprotein an die PMBs-A (Abb. 3.20. Spuren 1-3) feststellen, ebenso enthalten alle Pellets nach Dunkelinkubation kein Arrestin-GST (Abb. 3.20. Spuren 1, 4, 7). Nach Belichtung hat das Fusionsprotein an PMBs-N gebunden (Abb. 3.20. Spuren 4, 5), die Bindung an W-ROS ist in den belichteten Proben sehr schwach (Abb. 3.20. Spur 5). Die Auswertung dieser Versuche ergibt für Arrestin-GST eine Licht- und Phosphorylierungs abhängige Bindung an Rhodopsin.

**G:** Die Auswertung der Bindungs Assays von Arrestin-GST an PMBs und W-ROS erfolgte zusätzlich durch Inkubation des Blots (nach Strippen, 2.8.3.3.) mit anti-GST

Antikörpern. Diese bestätigt die in **F**: beschriebenen Resultate, zusätzlich wird in der 20 min belichteten Probe der PMBs-A eine geringe Menge an gebundenem Arrestin-GST festgestellt.



**Abbildung 3.20.:** Pellets der Zentrifugations-Bindungs-Assays. Westernblots nach Inkubation mit dem Antikörper S8D8 (A, B, F) oder dem anti-GST-Antikörper (G) und jeweils entsprechenden Sekundärantikörpern bzw. anti-6His-Peroxidase-Konjugat mit anschließender Chemolumineszenz. 1., 4., 7. Dunkelinkubation; 2., 5., 8. 1 min Belichtung; 3., 6., 9. 20 min Belichtung

**A:** Arrestin aus dem Rinderauge  
**C:** Arrestin-6His  
**E:** MRGS-6His-Arrestin

**B:** Arrestin-StrepTagII  
**D:** Arrestin-V244C-6His  
**F:** Arrestin-GST, Detektion mit dem Antikörper S8D8  
**G:** Arrestin-GST, Detektion mit anti-GST-Antikörper



Bei fast allen untersuchten, modifizierten Arrestinen findet nach einer Minute Belichtung an die PMBs-N die stärkste Bindung statt (Abb. 3.20. Spuren 5). Ein Vergleich der unterschiedlich lang belichteten Proben zeigt meist nach 1 min (Abb. 3.20. Spuren 2, 5) einen größeren Anteil an gebundenem Protein als nach 20 min (Abb. 3.20. Spuren 3, 6). Eine Erklärung dafür ist, daß der Arrestin-Rhodopsin-Komplex nach gewisser Zeit wieder zerfällt und somit zu Anfang gebundene Arrestine wieder aus dem Komplex entlassen werden. Dieser Effekt verstärkt sich noch durch eine Problematik in der Durchführung des Versuches. Die Proben nach 20 min Belichtung konnten nicht sofort im Anschluß zentrifugiert werden, und mußten einige Zeit im Dunkeln gelagert werden, in der der Arrestin-Rhodopsin-Komplex teilweise zerfallen konnte. Durch verlängerte Belichtung von 20 min sollte ein größerer Anteil der Rhodopsinmoleküle lichtaktiviert sein als nach nur 1 min Belichtungsdauer und somit mehr Arrestine binden können. Dies wird in den PMBs-A des Proteins MRGS-6His-Arrestin (Abb. 3.20. E: Spuren 2, 3), sowie den PMBs-N der Proteine Arrestin-StrepTagII und Arrestin aus dem Rinderauge (Abb. 3.20. A, B: Spuren 5, 6) bestätigt.

Die Bindung der Arrestine (mit Ausnahme des Arrestin-GST) an die W-ROS ist in diesem Versuch ungewöhnlich stark. Verschiedene Ursachen können dies bewirken. Wie schon erwähnt liegen etwa 1-2 % der Rhodopsinmoleküle in "dunkeladaptierten" Membranen lichtaktiviert und phosphoryliert vor (U. Wilden, pers. Mitteilung). Eine vollständige Dunkeladaptation ist nicht zu erreichen, da die Rinderaugen zur ROS-Präparation erst nach der Schlachtung der Rinder im Dunkeln gelagert werden. Durch Inkubation mit NADPH kann die Reduktion der in *all-trans* vorliegenden Retinal Moleküle herbeigeführt werden, die verwendeten Membranen wurden in dieser Hinsicht allerdings nicht behandelt. Die gewaschenen ROS enthalten noch lösliche Proteinanteile, so daß evtl. noch vorhandene Rhodopsinkinase nach Belichtung die Rhodopsinmoleküle phosphoryliert und Arrestinbindung initiiert. Eine weitere Fehlerquelle ist die Durchführung des Experimentes bei Rotlicht ( $\lambda > 620\text{nm}$ ), da auch noch bei dieser Wellenlänge Rhodopsin lichtaktiviert wird (U. Wilden, pers. Mitteilung). Somit ist eine Bindung in den "Dunkelproben" unabhängig von der Phosphorylierung in geringem Maß zu erwarten. Wie in Abschnitt II dieses Kapitels erwähnt, verfälscht ein gewisser Anteil an inaktivem Arrestin die Ergebnisse.

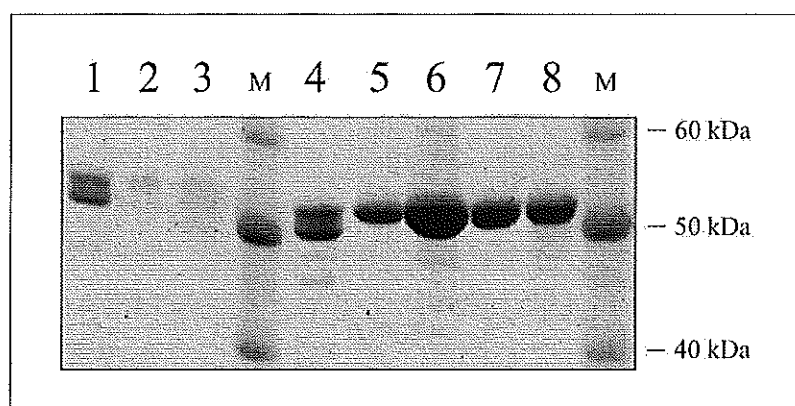
Eine Aussage über die Beeinflussung der Spezifität von Arrestin für phosphoryliertes Rhodopsin durch die N- und C-terminalen Modifikationen ist nicht möglich. Die Versuche lassen jedoch im Vergleich zum eingesetzten retinalen Arrestin keinen Unterschied in der Lichtabhängigkeit der Bindung der modifizierten rekombinanten Arrestine feststellen. Um definitive Aussagen zur potentiellen Beeinflussung von Bindung und Spezifität durch die N- und C-terminalen Modifikationen treffen zu können bedarf es Folgeexperimenten mit verschiedenen Arrestin-, PMB- und ROS-Präparationen. Wie die PMBs sollen dann auch die einzusetzenden ROS-Membranen belichtet und anschließend mit 11-*cis*-Retinal regeneriert werden.

### 3.6. Kristallisation von Arrestinen

#### 3.6.1. Kristallisation von retinalem Arrestin aus dem Rinderauge

Die Kristallisation von Arrestin aus dem Rinderauge erfolgte wie in Kapitel 2.15.1. (Wilden et al. 1997). Nur durch Optimierung der Bedingungen im Tropfen entstehen ausreichend große Kristalle. Das Alter des Puffers P6.1 hat einen nicht unerheblichen Einfluß auf das Kristallisationsverhalten von Arrestin aus dem Rinderauge (U. Wilden, persönliche Mitteilung). Arrestin Präparationen, welche mit frischem Puffer P6.1 kristallisieren, zeigen evtl. mit altem Puffer P6.1 (älter als 6 Monate) keine Kristallbildung. Die in der Lösung enthaltenen PEGs werden wahrscheinlich im Laufe der Zeit kurzkettiger (R. Gessenich, pers. Mitteilung).

Wie bereits erwähnt (1.5.) sind in der 3D-Struktur für die letzten 36 Aminosäuren keine definierten Elektronendichten sichtbar. Um nachzuweisen, daß die Kristalle das Arrestin in seiner Gesamtlänge enthalten und nicht eine proteolytisch verkürzte Form oder die Spleißvariante p44 vorliegt, wurden diese aufgelöst und im SDS-Gel sowie Westernblot untersucht. Die Vermutung bestand, daß während der langen Inkubationszeit ohne Kristallbildung über dem Reservoir der Zusammensetzung 10:10 (2.15.1.), Proteasen den C-Terminus von Arrestin angreifen können und somit anschließend ein verkürztes Arrestin kristallisiert. Zur biochemischen Analyse wurden Kristalle aus Ansätzen verschiedenen Alters sowie Kristalle verschiedener Größe geerntet, gewaschen und gelöst (2.15.3.). Als Vergleich wurde auf dem Gel nicht-kristallisiertes Protein einer typischen Arrestin Präparation aus dem Rinderauge aufgetragen. Die Kristalle stammten aus jeweils verschiedenen Arrestin Präparationen.



**Abbildung 3.21.:** Coomassie gefärbtes großes SDS Gel (12%). In den Spuren M ist die 10 kDa Ladder aufgetragen. 1. Arrestin aus dem Rinderauge; 2. Kristalle des Kristallisationsansatzes A; 3. Mutterlauge des Kristallisationsansatzes A; 4. Arrestin aus dem Rinderauge; 5. Tropfen des Kristallisationsansatzes B mit Kristallen; 6. Tropfen des Kristallisationsansatzes C ohne Kristallbildung; 7. Kleine Kristalle aus batch-Ansatz D; 8. Große Kristalle aus Kristallisationsansatz E

Abb. 3.21. zeigt die Analyse der Proben im Coomassie gefärbten, großen SDS-Gel. Deutlich ist die Auftrennung des nicht-kristallisierten Arrestins in eine Doppelbande zu sehen (Abb. 3.21. Spuren 1, 4). Beide Banden liegen über der 50 kDa Markerbande. Die Spuren 5-8 der Abb. 3.21. zeigen Protein aus gelösten Kristallen verschiedener Ansätze. In Abb. 3.21. Spur 3 ist die Mutterlauge eines Kristallisationsansatzes aufgetragen, die Spur 2 der Abb. 3.21. enthält das Protein der Kristalle dieses Ansatzes. Sämtliche Proben aus Kristallisationsansätzen zeigen definitiv nur eine Bande im Coomassie gefärbten SDS Gel. Diese Bande liegt exakt auf der Höhe der oberen Bande des nicht-kristallisierten Arrestins bei über 50 kDa. In keinem Fall lassen sich die Banden der Molekulargewichtsgröße von p44 zuordnen.

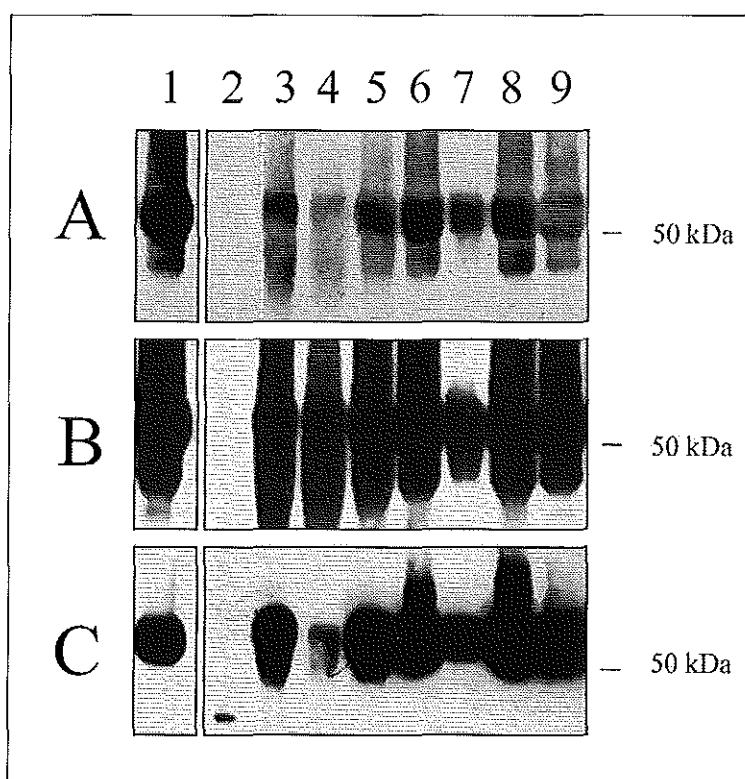
Zum immunologischen Nachweis der vollen Proteinelänge wurden die gleichen Proteinproben im Westernblot analysiert. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle eine Probe von p44 aus dem Rinderauge (Spur 2 A, B, C) aufgetragen. Die Detektion erfolgt nacheinander mit Antikörpern gegen den N-Terminus bzw. den C-Terminus von Arrestin.

Mehrere monoklonale Antikörper die ein N-terminales Epitop erkennen stehen zur Verfügung. Für die Bestimmung des am besten geeigneten Antikörpers mit den geringsten Kreuzreaktionen und dessen einzusetzende Verdünnung, wurden folgende Antikörper an geblottetem Arrestin aus dem Rinderauge vorher erprobt: A2C5, D9F2, F4C1, A9C6, S7D6, S8D8, AH<sub>2</sub>F1 und S6H8. Die Wahl für N-terminale Detektion fällt auf den Antikörper S7D6 der als Epitop die Aminosäuren 40 bis 50 erkennt und nur eine geringe Hintergrundfärbung verursacht. Zur Erkennung des C-Terminus steht nur ein Antikörper zur Verfügung. Der monoklonale Antikörper A9C6 erkennt die Aminosäuren 376 bis 386 als Epitop, zeigt jedoch starke Hintergrundfärbung.

Der Antikörper A9C6 detektiert alle Arrestin- und Kristallproben (Abb. 3.22. Spuren 1, 3-8A, B), jedoch nicht die p44 Probe (Abb. 3.22. Spur 2A, B). Nach Strippen des Blots und anschließender Inkubation mit dem Antikörper S7D6 wurden alle Proben detektiert (Abb. 3.22. Spuren 1-9 C). Der Nachweis des p44-Proteins erforderte jedoch eine äußerst lange Exposition des Chemolumineszenzfilms mit dem Substrat Super Signal Ultra (Abb. 3.22. Spur 2 C).

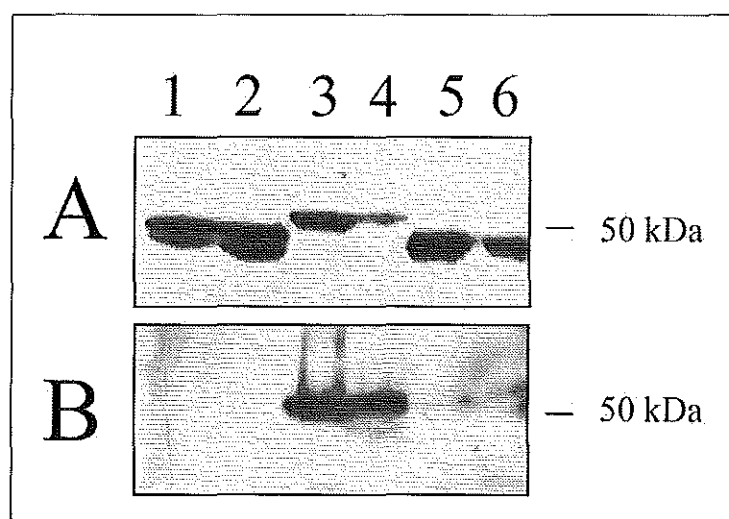
Die Spezifität der verwendeten Antikörper wurde auch an exprimiertem p44 in Hefesamtzellextrakten überprüft, da die Konzentration der gereinigten p44-Präparation aus Retinen (Abb. 3.22. Spur 2) äußerst gering war. In den Spuren 1, 2 und 5, 6 der Abb. 3.23. sind Totallysate von den p44 exprimierenden Klonen 71.13 (6His-Xa-p44; Spuren 1, 2) und 75.8 (6His-p44; Spuren 5, 6) aufgetragen. Die Spuren 3, 4 zeigen Totallysate von Arrestin-6His exprimierenden Klone 73.2. Deutlich wird, daß der Antikörper A9C6 definitiv nur ein Arrestin der vollen Länge erkennt (Abb. 3.23. Spuren 3, 4A, B). Die p44-Proteine wechselwirkten nur mit dem anti-His-Konjugat (Abb. 3.23. A).

Die hier dargestellten Westernblotanalysen beweisen, daß die Röntgenstruktur am vollständigen Protein aufgeklärt wurde (1.5.).

**Abbildung 3.22.:**

A: Blot nach Inkubation mit dem Antikörper A9C6 (C-Terminus), kurze Blotexposition  
 B: Blot nach Inkubation mit dem Antikörper A9C6 (C-Terminus), lange Blotexposition  
 C: Blot nach Inkubation mit dem Antikörper S7D6 (N-Terminus)

1. Arrestin aus dem Rinderauge; 2. p44 aus dem Rinderauge; 3. Kristalle des Kristallisationsansatzes A; 4. Mutterlauge des Kristallisationsansatzes A; 5. Große Kristalle aus Kristallisationsansatz E; 6. Kleine Kristalle aus batch-Ansatz D; 7. Tropfen des Kristallisationsansatzes B mit Kristallen; 8. Tropfen des Kristallisationsansatzes C ohne Kristallbildung; 9. Arrestin aus dem Rinderauge

**Abbildung 3.23.:**

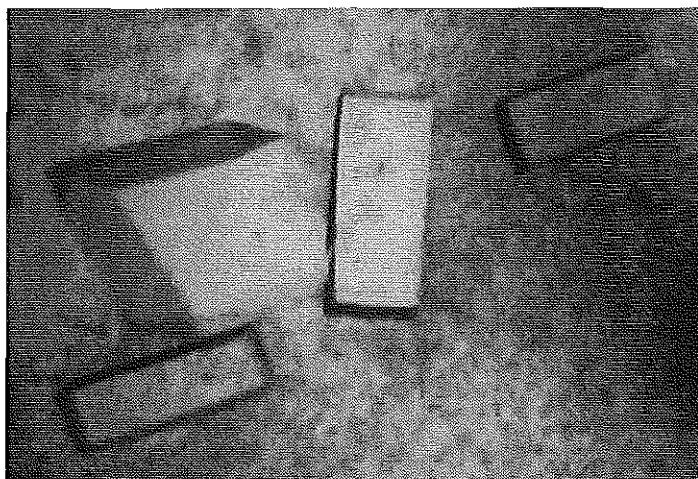
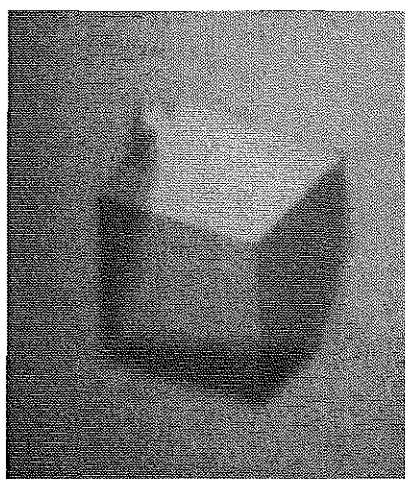
Westernblotanalyse von Gesamtzellextrakten nach Chemolumineszenz-Detektion und Inkubation mit A: anti-His-Peroxidase Konjugat, B: Antikörper A9C6 und entsprechendem Sekundärantikörper. 1., 2. Gesamtzellextrakte von Klonen 71.13 (6His-Xa-p44); 3., 4. Gesamtzellextrakte von Klonen 73.2 (Arrestin-6His); 5. 6. Gesamtzellextrakte von Klonen 75.8 (6His-p44)

### 3.6.2. Kristallisation von modifiziertem, wildtypischem Arrestin aus *S. cerevisiae*

Die Resultate der optimierten Kristallisationsbedingungen von MRGS-6His-Arrestin, Arrestin-6His und Arrestin-StrepTagII sind in Tab. 3.5. zusammengefaßt.

**Tabelle 3.5.:**

Protein	Konzentration	Reservoirpuffer, Tropfengröße	Kristallgröße (längste Kante)	Dauer der Kristallbildung	Darstellung (Protein im SDS-Gel)
MRGS- 6His- Arrestin	~36 mg/ml	10:4, 2 µl	0,60 mm	1 Tag	Abb. 3.12., Spur 11
		10:7, 2 µl	1,00 mm	1 Woche	
		10:7, 4 µl	0,45 mm	3 Tage	
		10:10 zu 10:4, 2 µl	0,20 mm	4 Wochen	
MRGS- 6His- Arrestin	~9 mg/ml	10:3, 2 µl	0,48 mm	1 Woche	Abb. 3.12., Spur 10
Arrestin- 6His	~10 mg/ml	10:3,	0,11 mm	3 Tage	Abb. 3.13., Spur 15
		10:4,	0,14 mm	3 Tage	
Arrestin- 6His	~26 mg/ml	10:3	0,29 mm	1 Tag	Abb. 3.13., Spur 16
		10:4	0,25 mm	1 Tag	
Arrestin- StrepTagII	~16 mg/ml	10:3	0,14 mm	3 Tage	Abb. 3.14., Spur 18

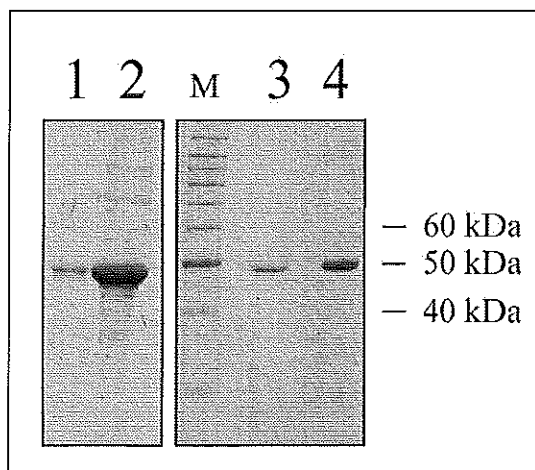


**Abbildung 3.24.:** Für Arrestin typische, orthorhombische, prismatische Kristalle von Arrestin-6His. Bei ungestörtem Kristallwachstum werden bevorzugt die Flächen {100}, {010} und {001} ausgebildet. In der linken Abbildung hat der Kristall eine Kantenlänge von ca. 0.2x0.2x0.2 mm<sup>3</sup>. Das Bild rechts zeigt bei 3 der 4 Kristalle eine bevorzugte Ausdehnung entlang der [001]-Richtung.

Die typische Kristallform der rekombinanten Arrestine zeigt Abb. 3.24., sie entspricht der des wildtypischen Proteins aus dem Rinderauge. Zu hohe Fällungsmittelkonzentrationen führten zu sehr kleinen Kristallen. Längere Lagerung von Arrestinlösung bei 4 °C minderte die Kristallqualität, d.h. die Abweichungen von der idealen orthorhombischen Form nahm zu. Proteinpräparationen mit einer Konzentrationen unter ~9 mg/ml konnten nicht kristallisiert werden. Die Proteine Arrestin-GST und p44 kristallisierten nicht unter "Arrestin-Bedingungen". Sie präzipitierten vollständig im Tropfen. Veränderte Kristallisationsbedingungen wären hier erforderlich.

### 3.6.3. Auflösen von Kristallen für analytische Zwecke

Kristalle von Arrestin-6His wurden auf die vollständige Aminosäurenlänge der kristallisierten Proteinmoleküle überprüft. Die aufgelösten Kristalle wurden mittels IMAC (2.9., Tab. 2.6.) von PEG- und Salzresten befreit und massenspektrometrisch untersucht (MALDI).



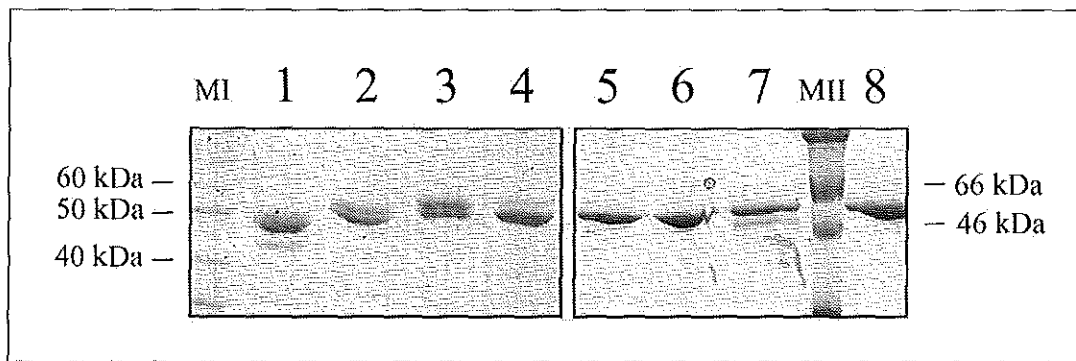
**Abbildung 3.25.:** Proteinproben von Arrestin-6His in Coomassie gefärbten SDS Gelen nach Schägger & von Jagow (2.8.1.). In der Spur M ist die 10 kDa Ladder aufgetragen. 1. Erster Überstand nach Lösung von Kristallen; 2. Zweiter Überstand nach Lösung von Kristallen; 3. nicht kristallisiertes Protein; 4. Protein aus Kristallen nach IMAC-Reinigung und anschließender Konzentration

Die Abb. 3.25. zeigt in den Spuren 1, 2, und 4 das aus aufgelösten Kristallen gewonnene Protein Arrestin-6His. Das Protein zeigt nach Kristallisation und anschließender Lösung der Kristalle nur eine Bande, entsprechend dem Arrestin aus dem Rinderauge (3.6.1., Abb. 3.21.). In Spur 4 der Abb. 3.25. ist Arrestin-6His aus Kristallen nach der IMAC Reinigung dargestellt, Spur 3 der Abb. 3.25. zeigt im Vergleich nicht kristallisiertes Arrestin-6His.

### 3.7. Proteinanalyse von Arrestinen mit biochemischen und spektroskopischen Methoden

Bei der Reinigung der verschiedenen N- und C-terminal modifizierten Arrestine sowie dem p44 zeigt sich, daß das isolierte Protein im SDS Gel immer aus einer Doppelbande besteht. Auch die Analysen von Gesamtzellextrakten im Westernblot ergeben zwei Banden. In Abhängigkeit von der Gellänge und -Prozentigkeit sind diese Banden unterschiedlich gut aufgelöst und erkennbar. Die Ausprägung der beiden Banden hängt zum einen von der Art des Proteins ab, zum anderen auch von der jeweiligen Präparation. Meistens sind beide Banden gleich stark ausgeprägt (Abb. 3.26. Spur 2, 3) nur bei MRGS-6His-Arrestin ist die untere Bande stets deutlicher (Abb. 3.26. Spur 4; auch 3.3.2.2.). Das Arrestin aus dem Rinderauge (verschiedene Präparationen, Abb. 3.26. Spuren 5-8) zeigt auch diese 2 Banden.

Beide Proteinbanden wurden sowohl von den verschiedenen verwendeten Antikörpern und Konjugaten gegen Arrestin, als auch gegen die Modifizierungen erkannt. Die Ursache ist wahrscheinlich in posttranslationalen Modifikationen und in Proteolyse begründet. Es ist bekannt, daß bei etwa 30 % der Proteinmoleküle von Arrestin aus dem Rinderauge eine N-terminale Acetylierung vorliegt und in 70 % aller Moleküle die ersten 4 Aminosäuren entfernt sind (SWISS-PROT: P08168). Rekombinante Arrestine wurden mit Isoelektrischer Fokussierung, Edmann-Abbau und massenspektroskopischen Methoden untersucht (3.7.1. bis 3.7.4.).

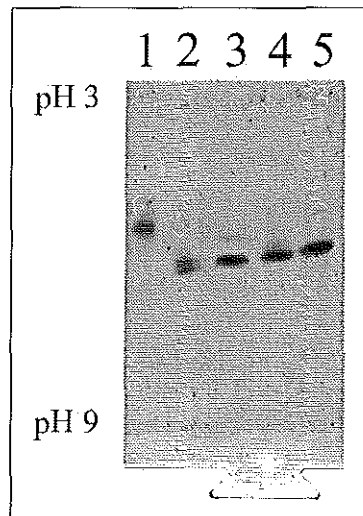


**Abbildung 3.26.:** Coomassie gefärbtes SDS Minigel nach Schägger & von Jagow (2.8.1., Spuren 1-4) bzw. 12%iges SDS Minigel (Spuren 5-8), etwa 1µg Protein pro Spur. In Spur MI ist die 10kDa Ladder aufgetragen, MII zeigt den HMW Marker. 1. Arrestin aus dem Rinderauge; 2. Arrestin-6His; 3. Arrestin-StrepTagII; 4. MRGS-6His-Arrestin; 5.-8. Arrestin aus dem Rinderauge, verschiedene Präparationen

#### 3.7.1. Überprüfung der Homogenität von Arrestinen mittels Isoelektrischer Fokussierung

Aus Rinderaugen isoliertes Arrestin hat eine stark ausgeprägte Mikroheterogenität. In der Isoelektrischen Fokussierung können bis zu 14 Banden im pH Bereich von 5,5 bis 6,1 definiert werden. Die Ursache dieser vielen Subspezies ist unklar. Zum Teil werden sie auf

die Herkunft aus verschiedenen Organismen (verschiedene Rinder, Kälber) zurückgeführt (1.4.1.; I. Weyand, Dissertation, 1988). Um die exprimierten Proteine auf ihre Mikroheterogenität hin zu untersuchen, wurden Proteinproben von MRGS-6His-Arrestin, Arrestin-6His, Arrestin-StrepTagII, und Arrestin-V244C-6His im Vergleich zum Arrestin aus dem Rinderauge mit Hilfe der Isoelektrischen Fokussierung analysiert. Die Proben sind (mit Ausnahme von Arrestin-V244C-6His) in Abb. 3.26. im SDS Gel dargestellt, und weisen alle die typischen 2 Banden auf. Das Arrestin aus dem Rinderauge fokussiert in zwei Hauptbanden und mehreren anderen Banden, die in *S. cerevisiae* exprimierten Proteine haben eine Hauptbande mit schmalen Nebenbanden. Zu berücksichtigen ist, daß es sich bei den verwendeten Proteinproben nicht um 100 % sauberes Arrestin handelt. Die drei mit 6 Histidinen modifizierten Arrestine haben alle einen ähnlichen pI-Wert, der im Vergleich zum wildtypischen Protein leicht zu niedrigeren pH-Werten verschoben ist. Der StrepTagII hat einen starken Einfluß auf den pI-Wert von Arrestin-StrepTagII, der sich in den sauren Bereich verschiebt.



**Abbildung 3.27.:** Isoelektrisches Fokussierungsgel im pH Bereich von 3-9, Gel nach Silberfärbung. Es wurde jeweils etwa 1 µg Protein geladen. 1. Arrestin-StrepTagII; 2. Arrestin aus dem Rinderauge; 3. MRGS-6His.Arrestin; 4. Arrestin-6His; 5. Arrestin-V244C-6His

### 3.7.2. Ermittlung der Masse von Arrestin-StrepTagII mittels Elektro Spray Ionisierung (ESI)

Das Protein Arrestin-StrepTagII wurde mittels ESI auf seine Masse geprüft, die Ergebnisse sind in Tab. 3.6. dargestellt. Das Spektrum ist im Anhang gezeigt.

Die Genauigkeit des Gerätes liegt bei 100 ppm (entspricht 0,01 %), so daß unter Berücksichtigung des Fehlers ein Verlust der beiden N-terminalen Aminosäuren Methionin und Lysin angenommen wird. Dies ist konsistent mit den Angaben für das wildtypische Arrestin aus dem Rinderauge, daß bis zu 3 Aminosäuren am N-Terminus fehlen können.



**Tabelle 3.6.:**

Protein	Berechnete Masse	Gemessene Masse	Fehler (%)
Arrestin-StrepTagII	46356 Da (wt=acetyliert)	46136 Da	- 0,47%
	46314 Da (n. acetyliert)		+ 0,38%
Arrestin-StrepTagII	wt – Met (131 Da)	46136 Da	+ 0,19%
	46225 Da		
Arrestin-StrepTagII	wt – Met-Lys (259 Da):	46136 Da	- 0,08%
	46097 Da		

### 3.7.3. N-terminale Sequenzierung (Edmann-Abbau) von retinalem Arrestin und Arrestin-6His

Mittels Edmann-Abbau wurde Arrestin-6His im Vergleich zum Arrestin aus dem Rinderauge N-terminal sequenziert (2.13.). Die Arrestinprobe aus dem Rinderauge ließ sich nicht sequenzieren, was auf eine N-terminale Blockierung durch Acetylierung hindeutet. Für das Arrestin-6His ergab sich nach 6 Abbauschritten folgende Sequenz:

NH <sub>2</sub> - NKPAPN...	Arrestin-6His
NH <sub>2</sub> - MKANKPAPN...	Arrestinsequenz, wildtypisch

Die ersten drei Aminosäuren Met-Lys-Ala fehlen bei Arrestin-6His. Dies ist jedoch konsistent mit der Eintragung in die Sequenzdatenbank, daß bei 70 % der wildtypischen Moleküle die N-terminalen ersten 4 Aminosäuren fehlen (3.7.). Das Fehlen dieser Aminosäuren kann z.B. durch Aminopeptidasen verursacht werden. Die Proteolyse des N-Terminus ist bei der 5. Aminosäure terminiert. Demzufolge ist das Auftreten von Zwischenstufen der Proteolyse erklärbar. T. Fischer konnte nach Edmann-Abbau alle Zwischenstufen von Protein voller Länge bis zum Fehlen der ersten 4 Aminosäuren detektieren (Dissertation, 1997).

### 3.7.4. Bestimmung der Masse von retinalem Arrestin sowie Arrestin-6His mittels Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)

Wildtypisches Arrestin aus dem Rinderauge, Arrestin-6His (unkristallisiert) und Arrestin-6His aus aufgelösten Kristallen wurden mittels MALDI analysiert.

Die Ergebnisse sind tabellarisch zusammengefaßt, die Massenspektren sind im Anhang dargestellt. Alle Messungen liegen im Fehlerbereich des Gerätes von (0,05 % bis 0,5 %).

Die Abweichung der gemessenen von der berechneten Masse des wildtypischen Arrestins und des nicht kristallisierten Arrestin-6His ist gering, so daß anzunehmen ist, daß die Proteine in voller Länge vorliegen. Eine Aussage über die Acetylierung ist nicht möglich, da die Masse dieser Modifikation unter der Auflösung des Gerätes liegt (2.12.1.).

**Tabelle 3.7.:**

Protein	Berechnete Masse	Gemessene Masse	Fehler (%)
BSA (Kalibrant)	66430 Da	66545 Da	+ 0,17%
Wildtyp. Arrestin	45317 Da (acetyliert)	45385 Da	+ 0,15%
Arrestin-6His	46097,8 Da (nicht acetyliert, wt+6His)	46059 Da	– 0,08%
Arrestin-6His aus Kristallen		45910 Da	– 0,41%

**Berechnungen:**

Arrestin-6His	wt – Met (131 Da): 45966,8	46059 Da	– 0,20%
Arrestin-6His aus Kristallen		45910 Da	– 0,12%
Arrestin-6His	wt – Met-Lys (259 Da): 45838,8	46059 Da	– 0,48%
Arrestin-6His aus Kristallen		45910 Da	+ 0,16%
Arrestin-6His	wt – Met-Lys-Ala (330 Da): 45767,8	46059 Da	– 0,63%
Arrestin-6His aus Kristallen		45910 Da	+ 0,31%
Arrestin-6His aus Kristallen	wt – Met-Lys-Ala-Asn (444 Da): 45653,8	45910 Da	+ 0,56%

Für die Arrestin-6His Proteine wurden verschiedene Proteingrößen und die resultierenden Fehler berechnet (Tab. 3.7.). Das kristallisierte Protein kann die volle Länge (inklusive 6His-Peptid) haben, möglich ist aber auch ein N-terminaler Verlust von bis zu 3 Aminosäuren. Ein Fehlen von maximal zwei Aminosäuren ist beim nicht-kristallisierten Arrestin-6His möglich. Diese Varianten liegen alle im Fehlerbereich des Gerätes. Die geringste Abweichung zwischen Meßwert und berechneter Masse erhält man bei Verlust der ersten Aminosäure (das Methionin). Unter Berücksichtigung der Resultate der N-terminalen Sequenzierung (3.7.3.) fehlen wahrscheinlich die ersten 3 N-terminalen Aminosäuren (Met-Lys-Asn).

Die geringe Auflösung des Gerätes ermöglicht keine Aussage über eine Differenz der Masse der nicht-kristallisierten und der kristallisierten Proteinprobe.

### 3.8. Röntgenstrukturanalyse von Kristallen aus rekombinantem Arrestin

Die Methode der Kryokristallographie bietet den Vorteil, daß Strahlenschäden am Kristall reduziert werden. Somit können vollständige und qualitativ bessere Daten an einem einzigen Kristall gemessen werden (Stura & Chen, 1992). Durch Tränken der Kristalle mit Kryoprotektaten wird ein Kristallisieren der Mutterlauge in den Solvenskanälen zwischen den Proteinmolekülen verhindert. Die am häufigsten verwendeten Kryoprotektate sind Ethylenglykol und Polyethylenglykole. Im Fall von Arrestin sind diese zwar in hohem Maße in der Mutterlauge enthalten (2.3.1.), jedoch optimiert eine zusätzliche Inkubation mit Glutaraldehyd das Einfrieren der Kristalle (J. Granzin, pers. Mitteilung). Der Prozeß des Einfrierens hat einen erheblichen Einfluß auf die Diffraktionsqualität eines Kristalls und somit auf die maximale Auflösung der Röntgenbeugungsdaten.

#### 3.8.1. Untersuchungen an nativen Kristallen

Die Messungen an nativen Kristallen wurden an einem Drehanoden-Röntgengenerator unter Kryobedingungen ( $T=100\text{K}$ ) (2.16.1.) vorgenommen, und dienten der Bestimmung von Symmetrie und Gitterkonstanten. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.8. zusammengefasst.

Tabelle 3.8.:

Protein	Gitterkonstanten [Å]; ( $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ ) $T=100\text{K}$	Raumgruppe (orthorhombisch)
Arrestin aus dem Rinderauge	a=171.22 b=188.77 c=90.93	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
MRGS-6His-Arrestin	a=171.66 b=190.0 c=91.83	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Arrestin-6His	a=168.62 b=185,17 c=90.68	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Arrestin-StrepTagII	a=167.98 b=186.31 c=90.47	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2

Die rekombinanten, nativen Proteine kristallisieren in der gleichen Raumgruppe wie das wildtypische, native Arrestin aus dem Rinderauge, nur die Gitterkonstanten variieren leicht.

Die kristallographischen Daten legen den Schluß nahe, daß keine Veränderungen in der Molekül-Packung durch die Modifikationen („Tag´s“) verursacht werden.

### 3.8.2. Untersuchungen an Schweratomderivaten

Da in der wildtypischen Arrestin-Struktur die C-terminalen 36 Aminosäuren keine Elektronendichte zeigen (Granzin et al., 1998) lag der Schluß nahe, das rekombinante Arrestin-6His einzusetzen um durch Derivatisierung der 6 Histidine mit Schweratomen eine indirekte Lokalisation des C-Terminus vorzunehmen.

Platin bildet mit Imidazolen kovalente Komplexe, und ist somit für eine Markierung von Histidin-Seitenketten geeignet (Blundell & Johnson, 1976). Die Koordination von Platinatomen an das wildtypische Arrestin sind bekannt (J. Granzin, pers. Mitteilung; Granzin et al., 1998), so daß zusätzliche Platinpositionen sehr wahrscheinlich am rekombinanten 6His-Peptid liegen.

Die verwendeten Schweratomverbindungen wurden im wesentlichen durch zwei Kriterien bestimmt: Die Bindungseigenschaften des Schweratoms an entsprechende Aminosäureseitenketten und die vorgegebenen Pufferbedingungen. Verbindungen, die in Umsetzungspuffer unlöslich sind, mit Puffersubstanzen reagieren, oder den pH-Wert beeinflussen sind nicht geeignet. Die Ermittlung der geeigneten Platinverbindung und seiner optimalen Konzentration bedarf entsprechender Versuchsreihen. Die Kontrolle erfolgt durch Röntgenbeugungsexperimente, falsche Bedingungen zerstören das Kristallgitter. Neben Platin sind auch Quecksilberverbindungen für die Markierung von Histidinen geeignet (Blundell & Johnson, 1976).

Die Daten der durchgeführten Experimente mit Schweratomlösungen sind in der folgenden Tabelle 3.9. aufgelistet. Die Schweratomverbindungen wurden in Umsetzungspuffer gelöst und die Kristalle darin mit den angegebenen Inkubationszeiten getränkt.

Die unterschiedlichen Platinverbindungen waren verschieden reaktiv mit dem Protein. Die Verbindung  $[\text{PtCl}_2(\text{C}_2\text{H}_4)]_2$  (1 mM und 24 h Tränkzeit) störte z.B. im erheblichen Maße die Ordnung des Kristallgitters, so daß keine Röntgendiffraktion mehr zu beobachten war (Tab. 3.9.). Eine Verkürzung der Tränkzeit auf 45 min erzeugte isomorphe Derivate, die Röntgendiffraktion aufwiesen.

Tabelle 3.9.:

Bedingungen			Resultate	
Schweratom- verbindung	Konzentration	Inkubations- dauer bei 17°C	Gitterkonstanten [Å] (100K)	$\Delta$ [%] (N <sub>a, b, c</sub> -D <sub>a, b, c</sub> )
-----	-----	-----	a=168,25 b=184,85 c=90,53 (nativ)	-----
K <sub>2</sub> PtCl <sub>6</sub>	1 mM	24 h	a=168,45 b=184,13 c=90,37	$\Delta_a$ =-0,11 $\Delta_b$ =0,38 $\Delta_c$ =0,18
K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub>	1 mM	24 h	a=169,29 b=184,03 c=90,42	$\Delta_a$ =-0,62 $\Delta_b$ =0,44 $\Delta_c$ =0,12
K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub>	5 mM	18 h	a=168,89 b=175,06 c=92,76	$\Delta_a$ =-0,38 $\Delta_b$ =5,30 $\Delta_c$ =-2,09
K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub>	5 mM	4 h	a=169,15 b=184,52 c=90,42	$\Delta_a$ =-0,53 $\Delta_b$ =0,18 $\Delta_c$ =0,12
“PIP“ [Pt <sub>2</sub> I <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> CH 2NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1 mM	24 h	a=169,41 # b=183,86 c=90,41	$\Delta_a$ =-0,69 $\Delta_b$ =0,54 $\Delta_c$ =0,13
[PtCl <sub>2</sub> (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> )] <sub>2</sub>	1 mM	24 h	-----*	
[PtCl <sub>2</sub> (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> )] <sub>2</sub>	1 mM	45 min	a=168,63 b=183,72 c=90,43	$\Delta_a$ =-0,23 $\Delta_b$ =0,61 $\Delta_c$ =0,11

\*= keine Diffraktion nach Derivatisierung

#=Daten wurden am Synchrotron gemessen

$\Delta$  [%] (N<sub>a, b, c</sub>-D<sub>a, b, c</sub>)=Differenz der Gitterkonstanten (nativer Kristall, N – derivatisierter Kristall, D)

Eine Änderung der Raumgruppe P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2 durch Derivatisierung ist nicht festzustellen.

Die Eignung von Schweratomderivaten für Röntgenbeugungsexperimente setzt Isomorphie voraus und kann an Änderungen der Gitterkonstanten abgelesen werden. Der tolerierbare Grenzwert liegt bei etwa 0,5 % Änderung in allen Raumrichtungen (Crick & Magdoff, 1956). Eine größere Abweichung von den nativen Daten würde eine Bewegung von Aminosäureseitenketten oder sogar von größeren Bereichen der Polypeptidkette bedeuten, die

durch die Bildung des Schweratomkomplexes hervorgerufen wurden. Eine Bestimmung der Schweratomkoordinaten ist nur dann möglich, wenn eine Änderung der Elektronendichte nur an den Stellen der Schweratoms substitution stattfindet, Isomorphie vorliegt (Blundell & Johnson, 1976).

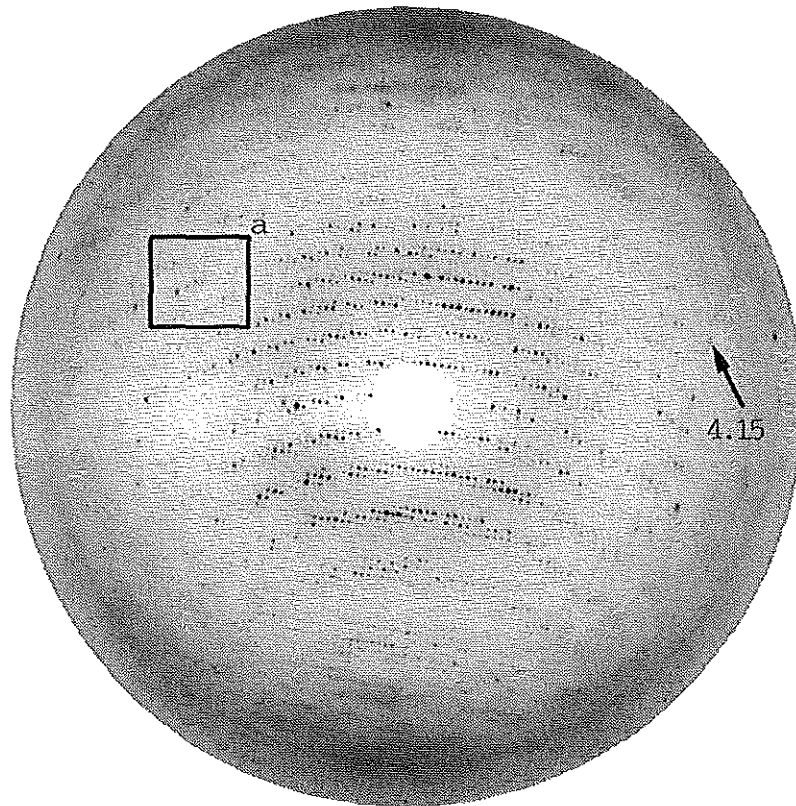
Die Berechnungen der Abweichungen der Gitterkonstanten der Derivate in Bezug zum nativen Kristall belegen Isomorphie für fast alle erzeugten Platinderivate. Nach 18 h Tränkzeit mit 5 mM  $K_2PtCl_4$  haben sich die Gitterkonstanten zu stark verändert, eine Inkubation mit 1 mM  $[PtCl_2(C_2H_4)]_2$  für 24 h stört die Ordnung im Kristallgitter so stark, daß keine Röntgenbeugung mehr möglich ist. Der mit "PIP" getränkte Kristall wurde aufgrund von Erfahrungswerten (Messungen an Kristallen von Arrestin aus dem Rinderauge; J. Granzin, pers. Mitteilung) ausgewählt.

### 3.8.3. Untersuchungen des "PIP"-Arrestin-6His Derivats

Der "PIP"-Arrestin-6His-Kristall wurde am Synchrotron (Daresbury, UK) unter Kryobedingungen ( $T=100K$ ; 2.16.1.) gemessen.

Eine Röntgenbeugungsaufnahme von Platin-derivatisiertem Arrestin-6His ist in Abb. 3.28. gezeigt, die maximale prozessierbare Auflösung beträgt 4.15 Å. Typisch sind für Beugungsaufnahmen von Arrestin die diffusen Ausschmierungen zum Rand hin, hervorgerufen wird dies u.a. durch eine partielle Fehlordnung in der Fernordnung (dies beschränkt auch den maximalen Beugungswinkel). Zusätzlich ist die Mosaizität des Kristalls durch den induzierten Streß beim Einfrieren sowie das Tränken mit "PIP" erhöht.

Die Auswertung dieser Daten mittels der Methode des Molekularen Ersatzes ergibt die gleiche Raumanordnung von Arrestin-6His wie für das Arrestin aus dem Rinderauge. Anschließende Differenz-Fouriers zeigen keine Elektronendichte für den C-Terminus, die Platin-Positionen sind alle an der N-terminalen Domäne der jeweiligen 4 Moleküle der asymmetrischen Einheit (1.5.) lokalisiert. Platin hat entweder nicht an das 6His-Peptid gebunden, oder es liegt nach wie vor eine Fehlordnung aufgrund der hohen Beweglichkeit dieses Proteinbereiches vor.



**Abbildung 3.28.:** Röntgenbeugungsaufnahme von Platin-derivatisiertem Arrestin-6His vom Synchrotron Daresbury (UK). Die Meßparameter dieser Rotationaufnahme sind: Temperatur  $T=100\text{K}$ , Wellenlänge  $\lambda=1.488\text{\AA}$ , Kristall-Detektorabstand  $DX=257\text{mm}$ , Rotation  $\Delta\phi=1.5^\circ$ . Der Pfeil markiert die maximale prozessierbare Auflösung von  $4.15\text{\AA}$ . Typisch für Beugungsaufnahmen von Arrestin sind die diffusen Ausschmierungen zum Rand hin (hier exemplarisch hervorgehoben in Box "a").

## 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war, ein heterologes Expressionssystem für retinales Arrestin zu entwickeln, um eine Grundlage für die Arrestin-Mutagenese zu schaffen.

Zu Beginn dieser Arbeit war außer dem *in vitro* Translationssystem in Retikulozytenlysat von Gurevich & Benovic (1992) kein System bekannt, rekombinantes Arrestin oder Arrestin-Mutanten zu erzeugen. Durch *in vitro* Translation ist Arrestin nur in geringen Mengen verfügbar, die zwar für Bindungstests genügen, nicht aber für die Kristallisation.

Arrestin kann in großen Mengen aus den Stäbchenaußensegmenten von Rinderaugen isoliert werden. Es wurden bereits verschiedene chromatographische Verfahren etabliert, die alle mehrere zeitaufwendige Chromatographieschritte kombinieren (Wacker et al., 1977; Dorey et al., 1982; Borthwick & Forrester, 1983; Zigler et al., 1984; Kasp et al., 1987; Mahlberg, 1989).

Auch die Reinigung von Arrestin über eine Antikörpersäule ist möglich (Banga et al., 1987). Denkbar wäre, daß hier die stringenten Elutionsbedingungen bei einem pH-Wert von 11,5 Einfluß auf die Aktivität von Arrestin nehmen. Es liegen jedoch keine Bindungsdaten von derart gereinigtem Arrestin an Rhodopsin vor.

Buczylo & Palczewski entwickelten (1993) ein chromatographisches Reinigungsverfahren, welches die spezifische Bindung von Arrestin an Heparin und Inositolhexaphosphat nutzt.

Die einfachste und schnellste Methode wurde von Wilden und Mitarbeitern (1986b) entwickelt, sie beruht auf der reversiblen Bindung von Arrestin an P-R\* und beinhaltet lediglich Zentrifugationsschritte. Das auf diese Weise isolierte Arrestin konnte erfolgreich kristallisiert werden, die Kristalle dienten der Strukturaufklärung (Wilden et al., 1997; Granzin et al., 1998).

### 4.1. Expression von Arrestin in *E. coli*

Zur Herstellung von funktionalem, rekombinanten Arrestin in *E. coli* wurden N-terminale Fusionen mit GST und MRGS-6His sowie eine C-terminale Fusion mit StrepTagI exprimiert. Dabei fanden unterschiedliche Regulationssysteme (tac-Promotor, T5-Promotor und tetA-Promotor) Verwendung. Mit C-terminalem StrepTagI wurde parallel zur cytoplasmatischen Expression auch die anschließende Sekretion des Proteins ins Periplasma untersucht. Alle Versuche führten zum gleichen Ergebnis und werden daher nicht getrennt diskutiert.

Die Expression in *E. coli* führte unter variierenden Bedingungen stets zu einem isolierbaren, löslichen Anteil an rekombinantem Arrestin. Diese Proteine zeigten jedoch in Lösung äußerst geringe Stabilität und neigten stark zur Präzipitation. Eine Konzentrierung der Proben war



nicht möglich (3.1.1. bis 3.1.3.). Der Hauptanteil des exprimierten Proteins (etwa 90 %) reicherte sich in Einschußkörpern, bestehend aus aggregiertem Protein, an.

Eine Möglichkeit mit den untersuchten Systemen eine größere Menge an löslichem und stabilem Arrestin in *E. coli* zu exprimieren, könnte eine Co-Expression von natürlichen, zusätzlichen Faltungsfaktoren, molekularen Chaperonen sein. In mehreren Fällen konnte so der Anteil an löslichem Protein in *E. coli* erhöht werden (Blum et al., 1992; Amrein et al., 1995; Hockney et al., 1995). Molekulare Chaperone assistieren bei der Proteinfaltung und beeinflussen durch ihre Menge und Spezifität Löslichkeit und Rückfaltung (Haase-Pettingell & King, 1988; Mitraki & King, 1989; Krueger et al., 1990; Gething & Sambrook, 1992; Georgopoulos & Welch, 1993).

MRGS-6His-Arrestin und Arrestin-StrepTagI wurden im Zentrifugations-Bindungs-Assay auf ihre Bindung an Rhodopsin überprüft. Für Arrestin-StrepTagI konnte bedingt eine lichtabhängige Bindung entsprechend dem wildtypischen retinalen Arrestin gezeigt werden, jedoch läßt die Interpretation der Resultate auf einen nicht geringen Anteil unspezifischer Bindung oder Denaturierung schließen. MRGS-6His-Arrestin präzipitierte unter den Bedingungen des Assays vollständig (3.1.4.; Abb. 3.6.).

Gray-Keller und Mitarbeiter (1997) konnten wildtypisches und mutiertes Arrestin (Arrestin-R175E) in *E. coli* unter Verwendung des Vektors pTrcHis-B in BL21-Zellen erfolgreich exprimieren. Die von ihnen angewandten Expressionsbedingungen (30 °C, 12 h Induktion mit 0,02 - 0,03 mM IPTG) führten mit den in dieser Arbeit beschriebenen Expressionssystemen jedoch zur Bildung von Einschußkörpern. Das von Gray-Keller und Mitarbeitern untersuchte Protein zeigte im Aktivitätstest die Eigenschaften des retinalen Arrestins. Dies deckt sich mit den Resultaten für Arrestin-StrepTagI (3.1.4.). Es liegen keine Informationen von Gray-Keller über die Ausbeute oder das Verhalten der rekombinanten Arrestine bei Konzentrierung vor, so daß unklar ist, ob das von ihnen exprimierte Protein für Kristallisationsexperimente verwendbar ist.

Die Expression von aktivem Arrestin in *E. coli* ist möglich, unter den in dieser Arbeit untersuchten Bedingungen war sie jedoch nur bedingt erfolgreich.

Rekombinantes Arrestin aus *E. coli* diene zur Aufklärung der gerade publizierten, verfeinerten Arrestinstruktur (Hirsch et al., 1999). Somit ist bewiesen, daß eine funktionale Expression dieses eukaryotischen Proteins in großen Mengen in dem prokaryotischen Wirt *E. coli* möglich ist. Es liegen noch keine Angaben über die von Hirsch und Mitarbeitern angewandten Expressions- und Reinigungsbedingungen vor (Schubert et al., im Druck).

## 4.2. Expression von Arrestin in *S. cerevisiae*

Da die Expression von Arrestin in *E. coli* unter den in dieser Arbeit geprüften Bedingungen nicht zu löslichem und stabilem Arrestin führte, wurde alternativ der eukaryotische Expressionswirt *S. cerevisiae* gewählt. Diese Entscheidung wurde auch dadurch beeinflusst, daß in *S. cerevisiae* ein Arrestin-ähnliches Protein immunologisch nachgewiesen werden konnte (Jeansonne et al., 1991).

### 4.2.1. Optimierung der Expressions- und Zellaufschlußbedingungen

Zur Optimierung wurde der Auswahl des Expressionsstammes, den Induktionsbedingungen (Medium, Induktionsdauer, Induktionsstärke) und dem Zellaufschluß besondere Bedeutung beigemessen (3.2.3.). Eine Optimierung war erforderlich, da gängige Protokolle nicht zum Ziel führten. So wird z.B. die Induktion der Überexpression für den verwendeten Vektor pYEX-BX bei einer OD<sub>600</sub> von 1 anstelle von 5 empfohlen, der Aufschluß der Hefezellen soll durch Sphäroplastierung und anschließende Behandlung mit Glasperlen erfolgen (YEXpress™ Expression Systems User Manual, Clontech). Diese Methodik führt lediglich zu einer Zellausbeute von ~1 Gramm Zellen pro Liter Kultur und im Fall von Arrestin auch zum proteolytischen Verlust des rekombinanten Proteins beim Zellaufschluß (3.3.1.).

Die Expression von Arrestin wurde mit und ohne Selektionsdruck (Minimalmedium ohne Leucin bzw. Vollmedium) in den Stämmen F11, YPH500, BJ2168 und BJ2407 vergleichend durchgeführt. Bei der Auswahl des Expressionsstammes spielten zudem auch die Wachstumseigenschaften der Stämme in Abhängigkeit von Medium und Kohlenstoffquelle eine Rolle. Mehrere Versuchsreihen ergaben, daß bei Verwendung des Vektors pYEX-BX eine Expression mit dem Stamm F11 in Minimalmedium ohne Leucin auf Galaktose, sowie Induktion mit 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> bei einer OD<sub>600</sub> von 5 für 5 Stunden zu optimalen Resultaten führt. Durch diese Optimierung auf Expressionsebene konnte eine große Zellmasse (~6 Gramm Zellen pro Liter Kultur) mit erheblichem Anteil an rekombinantem Protein (vergleichbar mit *E. coli*) als Ausgangsmaterial für die Proteinreinigung erzeugt werden.

Hefeproteasen, insbesondere ProteaseB, stellen generell ein erhebliches Problem bei der Expression rekombinanter Proteine dar (Emr, 1990; Jones, 1991; Jones, 1983; Moehle et al., 1987). Die Expression in BJ2168 und BJ2407, Stämmen mit multibler Proteasedefizienz (u.a. auch ProteaseB), erfolgte jedoch bei Arrestin nur in geringem Maße oder gar nicht. Da der Expressionsstamm einen erheblichen Einfluß auf die heterologe Expression nimmt (Fleer, 1992; De Baetselier et al., 1991) ist nach Etablierung der Expression eines Zielproteins ein Wechsel des Stammes nicht immer sinnvoll. Für zukünftige Expressionen wird in Erwägung gezogen, im hier erfolgreich eingesetzten Expressionsstamm F11 die ProteaseB gentechnisch zu inaktivieren. Die Eliminierung einer (ProteaseB) oder

mehrerer Proteasen sollte die Ausbeute und Homogenität von Arrestin entscheidend verbessern (K. D. Entian, pers. Mitteilung).

Der Zellaufschlußgrad nimmt einen starken Einfluß auf die Ausbeute, und wird, wie in Kapitel 3.3.1. besprochen, durch die Kupferinduktion bei Verwendung des Vektors pYEX-BX auch bei Benutzung einer French-Press erheblich vermindert. Der Expressionsstamm YPH500 zeigt diese Eigenschaft der verstärkten Zellwand durch Kupferionen nicht so ausgeprägt wie F11, jedoch überwiegt der Nachteil dieses Stammes: Die für die Zellausbeute ungünstigen Wachstumseigenschaften auf Minimalmedium (3.2.3.1.).

Das Wachstum des Stammes YPH500 auf Minimalmedium wird jedoch entscheidend beeinflußt durch seine Adenin Auxotrophie. Durch gentechnische Revertierung dieser Auxotrophie könnten die Wachstumseigenschaften dieses Stammes deutlich verbessert werden. Zudem besitzt er gegenüber dem Stamm F11 den Vorteil auf SD-Medium keine Zellaggregate zu bilden, so daß eine Expression auf Glukose möglich wäre. Dies ist wiederum gegenüber der Expression auf Galaktose von Vorteil, da die ProteaseB der Glukose-Repression unterliegt (Moehle & Jones, 1990). Die im Stamm YPH500 erzielten Expressionsraten waren vergleichbar mit denen im Stamm F11 (3.2.3.2.). Die Eliminierung der Adenin Auxotrophie würde die Zellausbeute dieses Stammes verbessern und ihn somit zu einem idealen Expressionsstamm für Arrestin machen.

#### **4.2.2. Reinigung der rekombinanten wildtypischen Arrestine sowie p44 aus *S. cerevisiae*; Betrachtung von Ausbeute und biochemischen Eigenschaften der Proteine**

Zur Reinigung von rekombinantem Arrestin wurde auf die herkömmlichen chromatographischen Methoden verzichtet und die Vorteile der Affinitätschromatographie genutzt. Dies war durch die gentechnische Fusionierung entsprechender Peptidsequenzen mit den Arrestinsequenzen möglich.

Durchschnittlich lassen sich bei der Arrestinexpression in *S. cerevisiae* aus einem Gramm Biofeuchtmasse etwa 40 µg gereinigtes und konzentriertes Protein isolieren (3.3.4.). Dies entspricht in etwa 0,5 % der Gesamtmenge an löslichem Protein. Die Proteinausbeute wird dabei durch verschiedene Faktoren beeinflußt, wobei sich diese in allgemeine und chromatographiespezifische aufteilen lassen. Den größten Einfluß auf alle Reinigungsverfahren haben, wie bereits ausführlich diskutiert, die Hefeproteasen (3.2.), der Zusatz von Proteaseinhibitoren beim Zellaufschluß ist somit essentiell. Entscheidend ist zudem der Zellaufschlußpuffer. Dies konnte von U. Eidhoff für das homologe Protein  $\beta$ -Arrestin gezeigt werden. Dieses Protein wurde im gleichen System (Stamm F11, Vektor pYEX-BX) exprimiert und zunächst analog zum retinalen Arrestin gereinigt. Durch Wechsel des Zellaufschlußpuffers von 10 mM HEPES, 400 mM NaCl, pH 7,5 zu 200 mM  $K_3PO_4$ ,

pH 7,5 konnte die  $\beta$ -Arrestin Ausbeute von etwa 50  $\mu$ g Protein pro Gramm Zellen auf bis zu 2 mg Protein pro Gramm Zellen erhöht werden (U. Eidhoff, pers. Mitteilung).

Dies bestätigte sich auch für das Protein p44 (3.4.4.). Dieses Protein ist bis Aminosäure 369 identisch zu Arrestin, die C-terminalen 35 Aminosäuren 370 bis 404 sind durch ein Alanin ersetzt. Im Vergleich zum wildtypischen Arrestin, das sich trotz pH-Änderung beim Zellaufschluß von pH = 7,5 in HEPES-Puffer auf pH ~ 5 in respektablen Mengen (40  $\mu$ g pro Gramm Zellen) isolieren läßt, ist in *S. cerevisiae* exprimiertes p44 unter gleichen Bedingungen dominant in der unlöslichen Fraktion. Nur ungefähr 3,5  $\mu$ g p44 pro Gramm Zellen lassen sich isolieren. Diese Tatsache erscheint mit dem Hintergrund der Literaturdaten zunächst nicht ungewöhnlich. p44 wird als membranassoziiertes Protein beschrieben (Palczewski et al., 1994a, b; Smith et al., 1994), ist in Lösung relativ instabil und neigt stark zur Präzipitation (A. Pulvermüller, pers. Mitteilung). Palczewski und Mitarbeiter fanden, daß der fehlende C-Terminus einen erheblichen Einfluß auf die Löslichkeit des Proteins hat (Palczewski et al., 1994a). Zunächst wurde dies auch durch die Expression in Hefe bestätigt (3.4.4.2. Abb. 3.17.). Der Wechsel des Zellaufschlußpuffers resultierte jedoch in etwa 1 mg pro Gramm Zellen isolierbarem, löslichem Protein, welches nach Umpufferung im Puffer 10/400 gute Stabilität zeigte. Die Vermutung liegt nahe, daß bei Zellaufschluß mit HEPES-Puffer trotz 400 mM NaCl das p44 an die Membranen von *S. cerevisiae* assoziiert. Im Vergleich zum wildtypischen Arrestin ist p44 sensitiver auf Schwankungen des pH-Wertes. Durch theoretische Berechnungen des pI-Werts und der pH-abhängigen Gesamtladung von Arrestin und p44 (Internet-Programm am EMBL, Heidelberg) wird deutlich, daß der Isoelektrische Punkt der beiden Proteine um fast 3 pH-Einheiten voneinander abweicht. Arrestin ist ungeladen bei pH 6,03, p44 bei pH 8,85. Das aus *S. cerevisiae* gereinigte p44-Protein wurde bisher noch nicht im Zentrifugations-Bindungs-Assay oder PDE-Test untersucht.

Es ist anzunehmen, daß sich die Ausbeute der verschiedenen Arrestine durch Verwendung des beschriebenen Phosphatpuffers entsprechend zu  $\beta$ -Arrestin und p44 auf etwa 2 mg pro Gramm Zellen erhöhen läßt. Dieser Puffer hält vor allem beim Zellaufschluß den pH-Wert von 7,5 konstant, dies ist auch im Hinblick auf Proteaseaktivität relevant, da ein niedriger pH-Wert Proteaseinhibitoren inaktivieren kann (Jones 1991).

Da das in dieser Arbeit entwickelte, heterologe Expressionssystem für retinales Arrestin auf das homologe  $\beta$ -Arrestin übertragen werden konnte, ist es wahrscheinlich, daß sich daher alle Proteine der Arrestin-Familie erfolgreich in *S. cerevisiae* exprimieren lassen. Die verschiedenen Proteine der Arrestin-Familie zeigen in ihrer Primärsequenz große Homologie. Es lassen sich 5 hoch konservierte Bereiche (Fingerprint-Regionen, Motive I bis V; 1.5.) definieren (Granzin et al., 1998; 1.5.). Lediglich die Familie der  $\beta$ -Arrestine enthält zusätzlich im C-terminalen Bereich eine konservierte Clathrin-Bindestelle (Krupnick et al., 1997; Hirsch et al., 1999). So besteht z.B. für medizinische Studien nun die Möglichkeit, große Mengen von humanem Arrestin aus Stäbchen wie auch aus Zapfen (X-Arrestin) herzustellen.

### GST-Glutathion Affinitätschromatographie

Prinzipiell haben sich GST-Fusionen nach prokaryotischer (3.1.1.) sowie eukaryotischer Expression (3.3.2.1. und 3.3.3.3.) als problematisch erwiesen. Zur Isolierung von wildtypischem Arrestin muß der GST-Anteil durch Proteolyse mit Thrombin entfernt werden. Anschließend besteht die Notwendigkeit Fusionsprotein, GST und auch vor allem Thrombin wieder aus der Arrestinlösung zu entfernen. Somit ist die Reinigungsprozedur relativ lang, mittels Glutathion-Sepharose gelingt die Separierung von GST, Fusionsprotein und Arrestin nur bedingt (3.3.2.1.). Im Vergleich mit den klassischen, chromatographischen Verfahren (s.o.) bietet diese Methode für die Arrestin-Isolierung keine Vorteile, das Ziel einer schnellen Isolierung von wildtypischem Arrestin konnte mit der GST Fusion nicht erreicht werden.

Es wurden in dieser Arbeit sowohl eine N-terminale als auch eine C-terminale GST-Fusion an Arrestin untersucht. Für GST-Arrestin konnte eine Instabilität der Fusion beobachtet werden (3.3.2.1.), wahrscheinlich durch Kontamination der Proteinlösung mit Thrombin über das verwendete Säulenmaterial. Die Protease Thrombin scheint durch Behandlung des Säulenmaterials mit 6M Guanidiniumhydrochlorid nicht entfernbare oder inaktivierbar.

Das Protein Arrestin-GST wurde nicht zur Reinigung von wildtypischem Arrestin erzeugt, sondern vielmehr um den Einfluß der Anwesenheit des 26 kDa Proteins bei der Bindung von Arrestin-GST an Rhodopsin zu untersuchen (3.5., III.). Bei der Reinigung dieses Fusionsproteins zeigte sich, daß sich auch eine in etwa equimolare Menge an GST co-isolieren ließ. Eine entsprechende Menge eines etwa 50 kDa großen Proteins konnte nicht identifiziert werden. Somit ist eine proteolytische Spaltung wie bei GST-Arrestin nicht wahrscheinlich. Eine schlüssige Erklärung für das Auftreten von GST alleine konnte nicht ermittelt werden. Es besteht eventuell die Möglichkeit, daß trotz der dazwischenliegenden Arrestinsequenz das Start-ATG von GST erkannt, und teilweise nur GST synthetisiert, oder der Arrestinanteil komplett proteolytisch entfernt wurde. Gegen den vollständigen proteolytischen Abbau würde sprechen, daß normalerweise bei N-terminaler Degradation von Arrestin, diese bei Aminosäure 5 terminiert ist. Dies wurde auch durch die N-terminale Sequenzierung von rekombinantem Arrestin (Arrestin-6His) aus *S. cerevisiae* in dieser Arbeit bestätigt (3.7.3.). Das mit GST verunreinigte Fusionsprotein wurde in Aktivitätstests eingesetzt, für Kristallisationsexperimente jedoch bedarf es einer zusätzlichen chromatographischen Reinigung zur Entfernung der GST.

### IMAC

Die chromatographische Reinigung von Arrestinen mit dem 6His-Peptid (bzw. MRGS-6His-Peptid) über IMAC war die erfolgreichste. Die an Nickelionen durchgeführte IMAC war schnell, gut reproduzierbar und resultierte in relativ sauberem, kristallisierbarem Protein.

Nachteilig bei dieser Art der Affinitätschromatographie ist das Verbot des Einsatzes von chelatierenden oder reduzierenden Agenzien bei Zellaufschluß und Reinigung. Zudem ist für die Entfernung von kontaminierenden Hefeproteinen ein Waschschrift mit Imidazol-haltigem (60 mM) Puffer essentiell für die Isolierung von sauberem rekombinantem Arrestin. Arrestin eluierte jedoch bereits schwach bei einer Imidazolkonzentration von 30 mM. Durch die große Menge an Waschpuffer war der Verlust an Arrestin jeweils erheblich (3.3.2.2., 3.3.3.1.). Eine Verlängerung der 6His-Modifikation auf 10 Histidine könnte die Affinität von Arrestin zum Säulenmaterial entscheidend verbessern.

Da die isolierten Proteinmengen für die Durchführung von Aktivitätstest und zur erfolgreichen Kristallisation ausreichen, wurde das Reinigungsverfahren nicht weiter optimiert. Durch Variation der Pufferzusammensetzungen, des Säulenmaterials (z.B. chelatierende Glasperlen anstelle von chelatierender Sepharose) oder der immobilisierten Metallionen (z.B.  $\text{Cu}^{2+}$  anstatt  $\text{Ni}^{2+}$ ) sollte sich die Ausbeute und Reinheit stark verbessern lassen.

### **StrepTagII/StrepTaktin-Affinitätschromatographie**

Die StrepTagII/StrepTaktin-Affinitätsreinigung macht sich eine, der Interaktion von Streptavidin und Biotin nachempfundenen, Bindung zu Nutze. Die Streptavidin-Biotin Affinität ist in ihrer Stärke mit der von Antigen und Antikörper vergleichbar. Der StrepTagII besteht aus den Aminosäuren: „ $\text{NH}_2\text{-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-COOH}$ “ und mimikriert das Biotin, StrepTaktin ist eine Streptavidin Variante und wurde speziell zur Bindung dieses Peptids generiert (Voss & Skerra, 1997).

Im Vergleich mit IMAC und der GST/Glutathion-Reinigung wurde für rekombinantes Arrestin mit diesem System jedoch die geringste Proteinausbeute erzielt (3.3.4., Tab. 3.2.). Obwohl die Kapazität der Säule nicht überschritten war, ließ sich jeweils nur ein Teil des rekombinanten Proteins an die Matrix binden. Durch Rechromatographie des Säulendurchflusses konnte zuvor nicht gebundenes Arrestin-StrepTagII zwar gewonnen werden, das Reinigungsverfahren wurde somit aber erheblich verlängert. Zudem war das isolierte Arrestin-StrepTagII trotz Inkubation der löslichen Fraktion vor der Chromatographie mit Avidin (2.9.) durch (evtl. biotinilierte) Hefeproteine kontaminiert. Warum Arrestin-StrepTagII eine solch geringe Affinität zu StrepTaktin zeigt ist unklar. Diese Beobachtung wurde auch unter entsprechenden Bedingungen bei der Reinigung von, mit StrepTagII modifiziertem, rekombinanten  $\beta$ -Arrestin gemacht (U. Eidhoff, pers. Mitteilung). Unwahrscheinlich ist, daß der C-Terminus von Arrestin samt StrepTagII nicht exponiert ist, da dieser große Flexibilität zeigt (1.5.). Vom NADH Dehydrogenase Fragment der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase konnten vergleichsweise über den StrepTagII und

entsprechendem Säulenvolumen (4 ml StrepTaktin-Sepharose, vergleiche 2.9., Tab. 2.6.) etwa 7 mg Protein gereinigt werden (S. Bungert, pers. Mitteilung).

Im Vergleich zum IMAC-Verfahren sind zusätzlich die hohen Kosten für StrepTaktin-Sepharose und Desthiobiotin zu erwähnen, so daß ein "Scale Up" dieses Verfahrens in dieser Hinsicht von Nachteil wäre.

### **Biochemische Eigenschaften der rekombinanten wildtypischen Arrestine**

Für retinales, bovines Arrestin ist bekannt, daß 30 % der Moleküle N-terminal acetyliert sind, sowie bei 70 % der Moleküle die N-terminalen 4 Aminosäuren fehlen (SWISS-PROT: P08168). Somit läßt sich die im SDS-Gel erkennbare Doppelbande bei rekombinanten und nativen Arrestinen (3.7., Abb. 3.26.) erklären. Beide Banden liegen dabei oberhalb der 50 kDa Markerbande. Im 0,1 %igen SDS-Gel befindet sich Arrestin (45317 Da) immer auf der Höhe von etwa 54 kDa, dies stimmt mit den Literaturdaten überein (Broekhuysse & Bessems, 1985). Die Anwesenheit der 6 Histidine (oder MRGS-6His) bzw. des StrepTagII bewirkt jeweils eine Verschiebung zu noch etwas höherem Molekulargewicht. Durch Erhöhung des SDS-Gehaltes im Gel auf 1 % verschiebt sich die Arrestin Bande zu 48 kDa (Broekhuysse & Bessems, 1985), dies korreliert mit dem von H. Kühn ermittelten Molekulargewicht des "48k-Proteins". Diese Literaturdaten können eventuell Hinweise darauf sein, daß die 2 Banden im SDS-Gel durch unterschiedliche Ladung (Beladung mit SDS) der Proteine bedingt sind.

Unwahrscheinlich ist, daß neben der Acetylierung noch weitere post-translationale Modifikationen bei Arrestin vorliegen, die das 2 Banden Muster erklären könnten. Es wurden zwar Phosphorylierungen und auch Glycosylierungen diskutiert (Banga et al., 1987; Weyand & Kühn, 1990), massenspektrometrische Untersuchungen (Ohguro et al., 1994; Buczylo & Palczewski, 1993) bestätigten diese jedoch nicht. Die in dieser Arbeit durchgeführten massenspektrometrischen Untersuchungen lassen aufgrund geringer Auflösung der Geräte leider keine Rückschlüsse auf Modifikationen zu. Die resultierenden Spektren (Anhang) ergaben jedoch in Konsistenz mit den Literaturdaten, daß an den rekombinanten Arrestinen bis zu 4 Aminosäuren N-terminal fehlen könnten. Die ergänzend durch Edmann-Abbau ermittelte Aminosäuresequenz der ersten 6 Aminosäuren von Arrestin-6His belegt den Verlust der ersten 3 N-terminalen Aminosäuren in der untersuchten Proteinpräparation. Es konnte bei dieser Präparation im SDS-Gel nur eine Bande detektiert werden.

Um die Ursache der zwei Banden im SDS-Gel zu ermitteln, sollen diese in zukünftigen Experimenten getrennt jeweils durch MALDI sowie tryptischen Verdau in Kombination mit MALDI untersucht werden.

Wie in den Kapiteln 3.3. und 3.7. gezeigt und diskutiert hängt das Auftreten und die Ausprägung der 2 Banden im SDS-Gel von der Proteinpräparation der Arrestine ab. Die Abb. 3.26. in Kapitel 3.7. zeigt das Auftreten dieser 2 Banden auch beim nativen, retinalen Protein, wobei ebenfalls die Präsenz und Ausprägung der zweiten Bande von der Präparation abhängt (U. Wilden, pers. Mitteilung; Wacker et al., 1977; Borthwick & Forrester, 1983). Die Heterogenität des nativen Arrestins aus dem Rinderauge wird wahrscheinlich durch Proteaseaktivität verursacht (Borthwick & Forrester, 1983). Unklar ist jedoch, ob der Angriff von Proteasen erst bei der Arrestin Isolation auftritt oder eventuell bereits in der Retina verschiedene Formen auftreten. Azarian und Mitarbeiter fanden 1995, daß Arrestin ein Substrat der retinalen Protease Calpain ist. Die Erkennungssequenz (PEST-Sequenz) liegt bei den Aminosäuren 357 bis 367. Calpain kann nach Bindung von Arrestin an P-R\* die C-terminalen 27 Aminosäuren von Arrestin entfernen, was in einem etwa 46 kDa großen Protein resultiert. Dieses verkürzte Arrestin zeigt im Vergleich zum Protein der gesamten Länge eine verstärkte Affinität zu P-R\* und verlangsamt somit die Dephosphorylierung von Rhodopsin (Azarian et al., 1995).

Geht man davon aus, daß Proteolyse die Ursache der Doppelbande ist, so stellt sich auch bei den rekombinanten Arrestinen die Frage, ob diese bereits *in vivo* stattfindet oder durch *in vitro* Aktivitäten von Proteasen verursacht wird. Rekombinantes Arrestin und p44 läßt sich zwar auch in Hefe-Gesamtzellextrakten meist als Doppelbande nachweisen, es ist jedoch bekannt, daß eine Vielzahl von *in vitro* Artefakten durch Hefeproteasen verursacht werden können (Pringle, 1975), durch SDS und Erhitzung können sie sogar erst aktiviert werden. Somit läßt sich auch erklären, daß durch Analyse im SDS-Gel von Gesamtzellextrakten, sowie Pellets und Überständen nach Zellaufschluß, das exprimierte Protein nicht immer erkennbar ist.

Bei zukünftigen Proteinreinigungen soll in allen verwendeten Puffern PMSF und EDTA eingesetzt werden. Dies sollte *in vitro* Proteaseaktivitäten unterdrücken und die Homogenität und Reinheit des gereinigten Arrestins noch verbessern. Das IMAC Verfahren ist diesbezüglich nachteilig, da man den wichtigen Proteaseinhibitor EDTA bei diesem System gar nicht, oder nur in geringen Konzentrationen (maximal 1 mM) verwenden kann.

Die in der Isoelektrischen Fokussierung beobachtete Mikroheterogenität von nativem, retinalem Arrestin (Wilden et al., 1986b; I. Weyand, 1988, Dissertation), kann zum einen auf die in diesem Kapitel bereits beschriebenen Differenzen in Acetylierung und Proteolyse des N-Terminus erklärt werden. Berücksichtigt werden müssen zudem (wie bei allen Proteinen) Deamidierungen von Glutamin- und Asparaginresten (Fágáin C.Ó., 1997). Auch die Herkunft aus verschiedenen Individuen trägt zur Heterogenität bei (I. Weyand, 1988, Dissertation). Die von Shinohara und Mitarbeitern (1987) durch Protein- und DNA-Sequenzierung ermittelte Arrestinsequenz weicht in 4 Positionen (Val 35, Leu 119, Val 177, Asp 317) von einer nur durch DNA-Sequenzierung von Yamaki und Mitarbeitern (1987) gefundenen ab. Anzunehmen ist, daß eine weitaus größere Variabilität besteht.



Zur Beurteilung der Homogenität der rekombinanten Arrestine wurde die IEF herangezogen. Die Analyse zeigte, daß die Homogenität prinzipiell größer ist als beim nativen Protein (Abb. 3.27.). Die mit 6 Histidinen modifizierten Proteine fokussieren vornehmlich in einer Bande, wobei der pI-Wert leicht ins Saure verschoben ist. Diese Tatsache spricht gegen die Möglichkeit, daß die 2 Banden der rekombinanten Arrestine im SDS-Gel durch unterschiedliche Ladung des Proteins bedingt sein können. Lediglich das mit StrepTagII modifizierte Arrestin zeigt schlechtere Homogenität als das native Protein, es lassen sich im IEF-Gel keine definierten Banden erkennen. Die exakten pI-Werte der rekombinanten Proteine wurden nicht ermittelt.

#### **4.2.3. Indikation und Relevanz der Expression von wildtypischem Arrestin mit verschiedenen N- und C-terminalen Modifikationen**

Man geht davon aus, daß durch Interaktion mit dem phosphorylierten C-Terminus von Rhodopsin, im Arrestin eine Konformationsänderung von einer inaktiven zu einer bindenden Form hervorgerufen wird. Nach Inkubation von Arrestin mit einem synthetischen Phosphopeptid, welches die Aminosäuren 330 bis 348 des Rhodopsin-C-Terminus beinhaltet, war Arrestin in der Lage sowohl an R\* als auch an C-terminal verkürztes R\* (ohne AS 330 bis 348) zu binden (Puig et al., 1995). Polyanionen wie Heparin oder Inositolhexaphosphat können ebenfalls die Konformationsänderung bewirken (Palczewski et al., 1991b, d). Die gängigen Reinigungsverfahren machen sich jedoch die Bindung von Arrestin an Rhodopsin (Wilden et al., 1986b) bzw. an Heparin und Inositolhexaphosphat (Buczylko & Palczewski, 1993) zu nutze. Es findet demnach bei der Reinigung die Konformationsänderung von Arrestin statt.

Das Ziel war, ein rekombinantes Protein zu produzieren, welches sich ausschließlich in der inaktiven Form befindet, und dadurch homogen ist. Somit wurden rekombinante Arrestine mit Modifikationen erzeugt, die eine einfache und schnelle, affinitätschromatographische Reinigung über die zusätzlichen Sequenzen ermöglichen.

Es gab keine Hinweise darauf, ob die Anwesenheit eines modifizierenden Peptids am C-Terminus Einfluß auf die Aktivität und Spezifität von Arrestin haben kann. Eine N-terminale Verlängerung um 6 Aminosäuren (Met-Asn-Thr-Ala-Ala-Ser) zeigte jedoch zum Beispiel, im Vergleich zu Arrestin der Gesamtlänge, veränderte Bindungseigenschaften (Gurevich & Benovich, 1992). Es ist zudem möglich, daß eine C- oder N-terminale Modifikation auch die Kristallisationseigenschaften erheblich beeinflusst.

Aus den beschriebenen Gründen wurden parallel verschiedene Konstrukte erzeugt und untersucht. Die in dieser Arbeit gewählten Affinitäts-Peptide haben unterschiedliche Länge sowie verschiedene Eigenschaften. Durch die GST-Fusion lassen sich nach Abspaltung des GST Anteils Arrestine separieren, welche nur um 2 Aminosäuren N-terminal verlängert sind.

Der sogenannte "6His-Tag" besteht aus 6 Histidinen (bzw. 10 Aminosäuren bei MRGS-6His) und ist unter physiologischen Bedingungen ungeladen. Dies zeigt sich auch durch die Untersuchung der Ladungsverteilung mit dem Programm SAPS (Statistical Analysis of Protein Sequences). Lediglich durch das Arginin des MRGS-Anteils wird eine zusätzliche positive Ladung eingeführt. Ähnlich verhält es sich mit dem StrepTagII, der aus 8 Aminosäuren besteht. Die Analyse mit SAPS ergibt sowohl eine zusätzliche negative als auch eine zusätzliche positive Ladung. Die Ladung der additiven, angehängten Aminosäuren ist in Bezug auf die Aktivität der rekombinanten Arrestine wichtig, da anzunehmen ist, daß die Spezifität von Arrestin für phosphoryliertes R\* durch die negativen Ladungen des phosphorylierten C-Terminus von Rhodopsin bewirkt wird.

Von Gurevich wird in seinem aktuellen Modell angenommen, daß zwei verschiedene Arten von intramolekularen Wechselwirkungen in der inaktiven Konformation von Arrestin bestehen (Gurevich, 1998). Als eine Möglichkeit wird die direkte Interaktion des kationischen N-Terminus mit dem anionischen C-Terminus vorgeschlagen (Gurevich et al., 1994). Die Betrachtung der Ladung der modifizierenden Peptide ist unter diesem Gesichtspunkt von besonderem Interesse. Zudem sollen N- und C- Terminus regulatorische Funktionen bei der Bindung an Rhodopsin ausüben. Es ist daher sinnvoll, Modifikationen sowohl am N-Terminus als auch am C-Terminus zu konstruieren, da experimentell ermittelt werden muß, ob diese die Aktivität oder Konformation von Arrestin beeinflussen können. Nur wenn ein Einfluß ausgeschlossen ist, können z.B. Veränderungen der Bindungseigenschaften von Arrestin-Mutanten auch eindeutig auf die Mutationen zurückgeführt werden.

In der publizierten Raumstruktur von Arrestin (Granzin et al., 1998) zeigt der C-Terminus große Flexibilität, es ist keine definierte Elektronendichte erkennbar. Kristalle von rekombinantem Arrestin sollten daher zur Aufklärung der Raumstruktur des C-Terminus von Arrestin herangezogen werden. Mit Schweratomen wie Platin oder Quecksilber läßt sich ein Peptid wie der "6His-Tag" gut markieren. Eine Verlängerung des C-Terminus durch 6 Histidine ist somit mit einer großen Wahrscheinlichkeit verbunden diese nach Markierung lokalisieren zu können.

Untersuchungen von Dorey und Mitarbeitern (1999) geben jedoch Anhaltspunkte dafür, daß nicht nur die negative Ladung, sondern evtl. eine durch die Phosphorylierung hervorgerufene Konformationsänderung des C-Terminus von Rhodopsin die Spezifität von Arrestin für P-R\* bedingt.

#### **4.2.4. Arrestin-Mutanten auf der Basis der dreidimensionalen Raumstruktur und dem aktuellen Bindungsmodell**

Um Erkenntnisse über den Bindungsmechanismus von Arrestin an Rhodopsin zu gewinnen, wurden auf der Basis der publizierten Raumstruktur (Granzin et al., 1998) Mutanten generiert.

Dabei wurde ebenfalls das aus verschiedenen Literaturdaten bekannte Bindungsmodell (im Folgenden dargestellt) zugrunde gelegt. Es wird bei diesem Modell angenommen, daß zur Stabilisierung einer inaktiven Konformation von Arrestin dessen N- und C-Terminus interagieren (Gurevich et al., 1994; Gurevich & Benovich, 1993a; Wilson & Copeland, 1997; Palczewski, 1994a; Palczewski et al., 1991c; Gurevich, 1998). Aufgrund der hohen Flexibilität des C-Terminus konnte zu diesem Punkt mit der Raumstruktur von Arrestin jedoch keine Aussage getroffen werden (Granzin et al., 1998). Die Induktion der Konformationsänderung von der inaktiven in eine bindende Form, soll durch Interaktion der Aminosäuren 158 bis 185 (Gurevich & Benovich, 1993a) [bzw. 163 bis 189 (Gurevich & Benovich, 1997)] mit dem phosphorylierten C-Terminus von Rhodopsin erfolgen. Es wird postuliert, daß dieser sozusagen den C-Terminus von Arrestin aus seiner Position "herausschiebt" (Puig et al., 1995; Ohguro et al., 1994; Palczewski, 1994b). Auch Heparin und Inositolhexaphosphat sollen diese Konformationsänderung bewirken können (Gurevich et al., 1994; Wilson & Copeland, 1997). Dem Arg 175 und seinen Interaktionspartnern Asp 30, Asp 296, und Asp 303 wird bei dieser Phosphorylierungs-Erkennung die Rolle eines für die Phosphorylierung sensitiven Triggers zugeordnet (Gurevich, 1998; Vishnivetskiy et al., 1999). Dies konnte anhand der vorliegenden Raumstruktur verifiziert werden (1.5.; Granzin et al., 1998).

Dem N-terminalen Bereich von Arrestin wird eine primäre Bindungsstelle mit den cytoplasmatischen Schleifen von Rhodopsin zugewiesen. Dabei spielt die Erkennung des lichtaktivierten Zustandes von Rhodopsin eine entscheidende Rolle. Diese Bindung soll bei Arrestin im Bereich der Aminosäuren 1 bis 191 stattfinden (Gurevich & Benovich, 1993a; Krupnick et al., 1994). Dafür sprechen unter anderem auch die Untersuchungen von Kieselbach und Mitarbeitern (1994), die fanden, daß die Aminosäuren 170 bis 182 in Arrestin durch die Bindung an Rhodopsin für einen, dieses Epitop erkennenden, Antikörper nicht mehr zugänglich sind. Neuere Studien von Smith und Mitarbeitern (1999) postulieren eine Bindung im Bereich der Aminosäuren 109 bis 130.

Dem C-terminalen Bereich von Arrestin wird eine sekundäre Bindestelle mit hydrophobem Charakter zugewiesen. Diese soll erst nach Phosphorylierungs- und Aktivierungs-Erkennung durch jeweils nachfolgende Änderung zweier verschiedener intramolekularer Interaktionen exponiert werden (Gurevich & Benovich, 1993a; Gurevich, 1998).

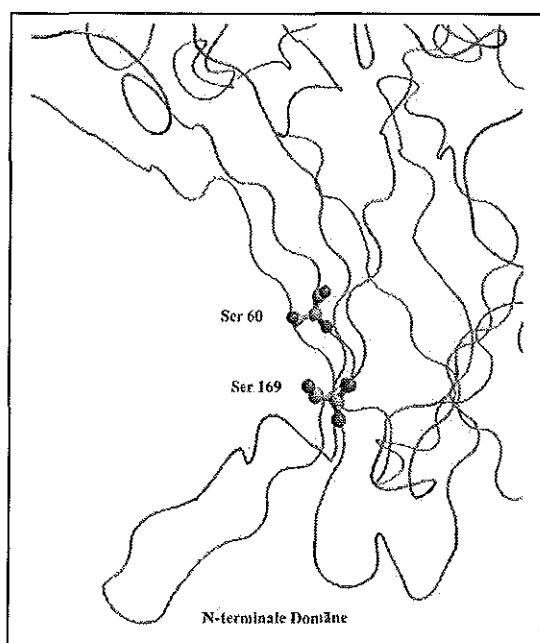
Grundlage für das in unserer Arbeitsgruppe entwickelte "Docking-Modell" (Bindung von Rhodopsin in der N-terminalen Kuppel) war zum einen die Annahme, daß, aufgrund der kuppelartigen 2 Domänen-Struktur, Arrestin das Rhodopsin wie eine Art Deckel abschirmt und somit weitere Interaktionen der cytoplasmatischen Schleifen von Rhodopsin mit Transducin sterisch verhindern kann. Hinzu kommt, daß ein großer Teil der durch Bindungsstudien als funktionell identifizierten Bereiche (s.o.) sich in der Struktur auf die N-terminale Kuppel, speziell die Innenseite und die Randbereiche, konzentrieren.

Die vorgeschlagene Phosphorylierungs-Erkennungs-Domäne soll vornehmlich im Bereich der Aminosäuresequenz 158 bis 185 liegen (Gurevich & Benovic, 1993, 1997). Diese Teilsequenz tritt auch in Motiv III auf, einem der fünf hoch konservierten Motive der bekannten Arrestin-Sequenzen (1.5., Granzin et al., 1998). Das N-terminale Segment mit den Aminosäuren 56 bis 91 (Teil von Motiv II), 129 bis 175 (Teil von Motiv III) sowie die Reste Lys 2, Lys 15 und Arg 18 könnten in der konkaven Kuppelseite mit der cytoplasmatischen Seite von P-R\* in Kontakt treten. Das Arg 175 ist zudem von der N-terminalen Kuppelinnenseite zugänglich (Granzin et al., 1998).

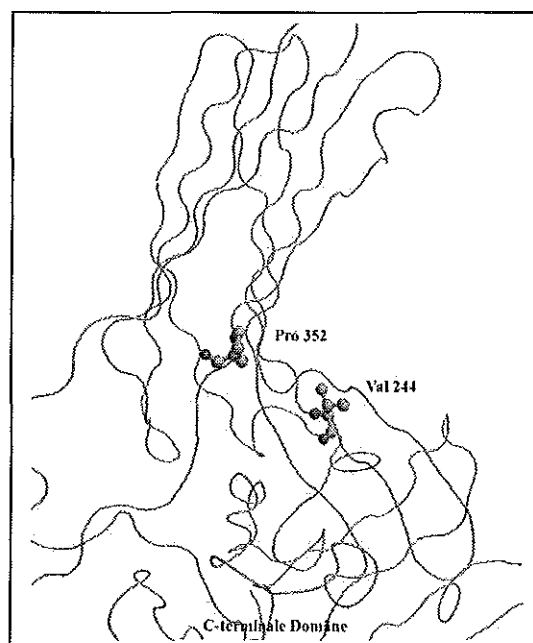
Die spezielle Zielsetzung der Mutagenese von Arrestin in dieser Arbeit war, die primäre Bindungsstelle an Rhodopsin der N- bzw. C-terminalen Kuppel von Arrestin zuordnen zu können. Des weiteren sollte überprüft werden, ob diese Bindung an der Kuppelinnenseite stattfindet. Smith und Mitarbeiter (1999), diskutieren z.B. andere primäre Interaktionsflächen zwischen Arrestin und P-R\*, etwa außerhalb der Kuppelinnenseiten.

Zur Mutagenese wurden anhand der 3D-Ansicht der Arrestinstruktur in jeder Domäne zwei Aminosäuren ausgewählt, deren Seitenketten in die Kuppelinnenseite hinausragen und keine Interaktion mit anderen Aminosäureseitenketten des Proteins eingehen (Abb. 4.1. und 4.2.).

Es wurden so die Aminosäuren Ser 60, Ser 169, Val 244 und Pro 352 ausgesucht und gentechnisch durch Cysteine ersetzt. Durch kovalente Bindung dieser Cysteine an Biotin-PEO-Maleimid können die konkaven Kuppelinnenseiten selektiv sterisch blockiert werden. Dieses Maleimid-Derivat erlaubt (im Gegensatz zu z.B. Fluorescein-5-Maleimid) durch Biotin-Streptavidin-Chromatographie nach der Kopplungsreaktion eine Abtrennung der nicht-biotinilierten Moleküle. Somit können die Bindungsstudien an einer einheitlichen Population von biotinilierten Molekülen vorgenommen werden.



**Abbildung 4.1.:** Darstellung der Mutagenesestellen in der N-terminalen Domäne: Ser 60 und Ser 169.



**Abbildung 4.2.** Darstellung der Mutagenesestellen in der C-terminalen Domäne: Val 244 und Pro 352.

Den zur Mutagenese ausgewählten Aminosäuren wird bislang im speziellen keine Funktion zugeordnet. Dies ist neben der räumlichen Zugänglichkeit entscheidend, da Mutanten mit wildtypischem Verhalten erzeugt werden sollen. Eine Abweichung vom wildtypischen Bindungsverhalten der Mutanten soll erst nach der beschriebenen Biotinilierung durch sterische Hinderung auftreten. Es wurden in jeder Kuppel zwei alternative Aminosäuren mutiert, um im Falle einer Abweichung vom wildtypischen Verhalten bei einer Mutante auf das alternative Protein ausweichen zu können.

In Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß unter bestimmten Reaktionsbedingungen die natürlichen Cysteine (Cys 63, Cys 128 und Cys 143) zugänglich sind (Palczewski et al., 1992b). Daher wurden diese nach Überprüfung mit dem Programm "Verify 3D" (Bowie et al., 1991) durch Serine ersetzt. In der Raumstruktur von Arrestin sind die Cysteine zwar nicht an der Oberfläche zu finden, jedoch kann dadurch eine Zugänglichkeit generell nicht ausgeschlossen werden (J. Granzin, pers. Mitteilung). Bei dem Versuch der Reinigung von Arrestin-C-S-6His, Arrestin-S60C-6His und Arrestin-S169C-6His konnte kein lösliches Protein isoliert werden, obwohl Expression der rekombinanten Arrestin Mutanten in Hefe-Gesamtzellextrakten nachgewiesen wurde (3.4.3.). Lediglich für das Protein Arrestin-P352C-6His konnte keine Expression erreicht werden, was jedoch auf Mutation oder Rekombination im Vektor pYEX-BX zurückzuführen ist. Durch erneute Herstellung des genetischen Konstrukts dieses Klons wird sich eine Expression erreichen lassen.

Die bisher einzige, isolierte Arrestin Mutante ist Arrestin-V244C-6His. Dieses Protein konnte mit einer Ausbeute von etwa 15 µg Protein pro Gramm Zellen gereinigt werden, dies entspricht weniger als der Hälfte einer Ausbeute an wildtypischem Arrestin (3.3.4.). Das unterschiedliche Verhalten der Arrestin-Mutanten in Bezug auf ihre Löslichkeit läßt, unter der Berücksichtigung der Erfahrung mit dem Protein p44 (3.4.4., 4.2.2.), die Schlußfolgerung zu, daß die aliphatischen Serine in der N-terminalen Domäne (Ser 60, Ser 169) sowie auch die Cysteine (Positionen Cys 63, Cys 128 und Cys 143) erheblich zur Stabilität und Löslichkeit von wildtypischem Arrestin beitragen. Die Cysteine bilden jedoch im nativen Arrestin keine Cysteinbrücken aus (Granzin et al., 1998). Der Austausch dieser Aminosäuren hat anscheinend eine größere destabilisierende Wirkung als die Substitution des Val 244 mit Cys. Ein Reinigungsverfahren für die Arrestin-Mutanten muß in zukünftigen Experimenten noch etabliert werden. Aufgrund des guten Resultats bei p44 nach Verwendung von Phosphatpuffer beim Zellaufschluß (3.4.4., 4.2.2.) soll diese Methode auch hier Anwendung finden. Bisher ist jedoch noch nicht gezeigt, daß die bisher unlöslich erscheinenden Mutanten sich wie das p44 unter Verwendung von Phosphatpuffer als löslich und stabil erweisen werden. Die Untersuchung der Mutanten im nativen und biotinilierten Zustand mittels Zentrifugations-Bindungs-Assays sowie PDE-Tests (Liebman & Evanczuk, 1982) soll drüber Aufschluß geben, ob Rhodopsin mit einer der Kuppelinnenseiten interagiert oder sogar beide Stellen wichtig sind.

#### 4.2.5. Untersuchung der Bindungseigenschaften der rekombinanten Arrestine im Zentrifugations-Bindungs-Assay sowie Interpretation der Resultate

Im Kapitel 3.5. wird das Bindungsverhalten der verschiedenen rekombinanten Arrestine sowie des nativen Arrestins aus dem Rinderauge gezeigt und beschrieben. In verschiedenen Ansätzen wurde die Bindung an phosphoryliertes oder natives Rhodopsin in Abhängigkeit von der Belichtung untersucht. Zusammenfassend läßt sich zunächst feststellen, daß dieser Assay auch unter Verwendung der gleichen Rhodopsinpräparationen schlechte Reproduzierbarkeit zeigt. Insbesondere die Versuche an native ROS sind nur bedingt aussagekräftig, was u.a. dadurch begründet sein kann, daß keine Harnstoff-gewaschenen Membranen verwendet wurden. In den nativen ROS Membranen sind somit noch lösliche und membranassoziierte Proteine wie auch die Rhodopsinkinase enthalten, so daß nach Belichtung möglicherweise eine Phosphorylierung stattfinden kann. Der natürliche Gehalt an, zur Phosphorylierung notwendigem ATP, ist in ROS Suspensionen jedoch sehr gering (U. Wilden, pers. Mitteilung). Der Zusatz z.B. des Kinase-Inhibitors FSO<sub>2</sub>BzAdo (5'-[p-(Fluorosulfonyl)benzoyl]adenosine) könnte eine Phosphorylierung in den belichteten Reaktionsansätzen jedoch ausschließen (Palczewski et al., 1988). Prinzipiell ist es zudem nicht möglich, wirklich unphosphorylierte, native ROS einzusetzen, da stets etwa 1 % bis 2 % der Rhodopsinmoleküle in dunkeladaptierten ROS lichtaktiviert und phosphoryliert vorliegen. Dies wird auch als "Dunkelaktivität" bezeichnet (U. Wilden, pers. Mitteilung). Durch Inkubation mit NADPH kann jedoch die Reduktion der in *all-trans* vorliegenden Retinalmoleküle bewirkt werden, was die "Dunkelaktivität" stark verringert. Eine zusätzliche Fehlerquelle ist die Durchführung der Experimente bei Rotlicht, da auch noch bei einer Wellenlänge von  $\lambda > 620\text{nm}$  Rhodopsin aktiviert werden kann (U. Wilden, pers. Mitteilung).

Für den Zentrifugations-Bindungs-Assay wird auch in der Literatur immer eine Bindung von Arrestin an sowohl P-R, R\* und auch R dokumentiert. Dabei ist das Verhältnis im Durchschnitt das folgende:

Arrestin bindet an P-R\* = 100 %; an R\* = 20 %; an P-R = 10 %; an R = 5 %

(z.B. 20 % bedeutet eine fünffach schwächere Bindung in Bezug zur Bindung an P-R\*)

Diese Durchschnittswerte wurden aus verschiedenen Veröffentlichungen von Gurevich und Mitarbeitern entnommen. Sie zeigen jedoch, daß die beschriebene Spezifität von Arrestin für P-R\* sich in diesem Assay durch eine etwa fünffach stärkere Bindung gegenüber R\* auszeichnet (für die Experimente wurden Harnstoff-gewaschene Membranen verwendet). Mit diesem Hintergrund wird deutlich, daß bei diesem Assay eine Bindung von Arrestinen an P-R\* überwiegen sollte, die Bindung an P-R, R\* und R aber im Rahmen der dargestellten Prozentigkeiten auch möglich ist.

Das in Abschnitt III in Kapitel 3.5. beschriebene Experiment zeigt deutlich für rekombinantes und retinales Arrestin, eine außergewöhnlich starke, lichtunabhängige Bindung an die nativen, gewaschenen ROS. Da auch das retinale Arrestin eine ungewöhnlich starke Bindung an diese ROS-Präparation zeigt, ist anzunehmen, daß diese Membranen bei der Präparation wahrscheinlich belichtet wurden. Wilden und Mitarbeiter berichteten 1986, daß in den nach ihrer Methode gereinigten Arrestin-Präparationen auch Kinase-Aktivität zu finden war, dies könnte eine zusätzliche Phosphorylierung der eigentlich "unphosphorylierten" Proben bewirken. Die in dieser Arbeit verwendeten retinalen Arrestinproben wurden nach der Methode von Wilden und Mitarbeitern (1986) gereinigt.

Im Vergleich mit allen anderen eingesetzten Arrestinen war die Bindung von Arrestin-StrepTagII an die nativen ROS besonders stark (Abb. 3.20.). Dies könnte ein erster Hinweis auf eine Veränderung der Spezifität für P-R\* durch den StrepTagII sein, es bedarf jedoch weiterer Experimente um dies zu beweisen. Betrachtet man alle in dieser Arbeit durchgeführten Assays, so konnte für Arrestin-6His reproduzierbar eine definitiv lichtabhängige Bindung an P-R\* gezeigt werden, es ist keine Bindung an P-R festzustellen. Die Mutante Arrestin-V244C-6His zeigt das gleiche Verhalten. Dies könnte ein erster Hinweis darauf sein, daß die C-terminale Verlängerung um 6 Histidine bei Phosphorylierung die Selektivität von Arrestin in Bezug auf Lichtaktivierung verstärkt. Es bedarf einer ausführlichen, weiteren Untersuchung um dies zu beweisen.

Die durchgeführten Bindungsassays zeigen für alle Arrestine stets eine bevorzugte Bindung an P-R\* gegenüber P-R. In keinem Fall konnte eine gleich starke oder stärkere Bindung nach Dunkelinkubation gegenüber Belichtung festgestellt werden. Somit ist gezeigt, daß die rekombinanten, wildtypischen Arrestine und auch die Mutante Arrestin-V244C-6His wie das native Arrestin aus dem Auge bei Phosphorylierung bevorzugt nach zusätzlicher Lichtaktivierung binden.

Um detaillierte Aussagen über eine Beeinflussung der Aktivität und Spezifität durch die Modifikationen treffen zu können, müssen die Zentrifugations-Bindungs-Assays teilweise abgewandelt wiederholt werden. Vor allem muß mit unterschiedlichen Arrestinpräparationen bzw. unterschiedlichen Rhodopsin-Suspensionen (PMBs und ROS) experimentiert werden. Die Abweichungen der gebundenen Arrestinmengen an die zwei eingesetzten, unterschiedlichen PMB Präparationen (3.5.), belegen die Notwendigkeit von erweiterten Versuchen. Es wird dadurch deutlich, daß der Vergleich von unterschiedlichen PMB Präparationen nur schlecht möglich ist. Dies gilt auch generell für den Vergleich von PMBs und ROS. Die besten Voraussetzungen sind gegeben, wenn ROS und PMBs auch aus der selben Ausgangs ROS-Präparation stammen. Die Membranen sollten jeweils mit Harnstoff gewaschen und anschließend belichtet und regeneriert werden (2.10.3., keine Zugabe von ATP bei ROS). Ergänzend sollen in weiterführenden Experimenten die rekombinanten Arrestine auf ihre Fähigkeit die Phosphodiesterase-Aktivität zu quenchen (Liebman & Evanczuk, 1982; Wilden et al., 1986a) überprüft werden. Für Bindungskinetiken werden

Lichtstreuungs-Experimente in Zusammenarbeit mit dem Labor von K.P. Hofmann (FU Berlin) erfolgen.

Von besonderem Interesse auch für zukünftige Experimente sind die rekombinanten Fusionsproteine von Arrestin mit GST. Für Arrestin-GST kann eindeutig eine lichtabhängige Bindung an P-R\* dokumentiert werden, auch GST-Arrestin bindet bevorzugt an P-R\* (3.5.). Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Fusion von Arrestin mit dem 26 kDa Protein GST weder N- noch C-terminal durch sterische Hinderung die spezifische Bindung an P-R\* ändern kann. Dies ist insbesondere bei Arrestin-GST erstaunlich, da es sterisch und thermodynamisch höchst unwahrscheinlich ist, daß sich der C-Terminus von Arrestin wie postuliert (Ohguro et al., 1994; Palczewski, 1994) mit diesem Anhang bewegen und somit vom phosphorylierten C-Terminus des Rhodopsins "weggeschoben" werden kann.

Damit ist ein weiterer Hinweis gegeben, daß die postulierte Transformation von einer inaktiven in eine bindende Konformation von Arrestin nur geringe Änderungen im N- und C-terminalen Bereich des Moleküls beinhalten kann. Eventuell nur Änderungen der Seitenkettenkonformationen (Palczewski et al., 1992b). Dies wurde bereits von Wilson & Copeland (1997) unterstützt, die nach spektroskopischer Charakterisierung der Interaktion von Arrestin mit Heparin und Inositolhexaphosphat im Gegensatz zu Schleicher und Mitarbeitern (1989) nur minimale Änderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur schlußfolgerten.

#### **4.2.5. Eine Anwendungsmöglichkeit des Hefe-Expressionssystems: Anhaltspunkte zur Entwicklung eines *in vivo* Testsystems**

Die Untersuchung der Bindung von Arrestin an Rhodopsin kann mit den bestehenden Testsystemen (Zentrifugations-Bindungs-Assay, Phosphodiesterase-Test (Liebman & Evanczuk, 1982), Extra-MetaII-Assay (Schleicher et al., 1989) , Lichtstreuversuche (Schleicher & Hofmann, 1987) nur *in vitro* erfolgen. Bislang gibt es keine Möglichkeit diese Bindung wie z.B. für  $\beta$ -Arrestin (Barak et al., 1997; Zhang et al., 1999; Barak et al., 1999) innerhalb einer Zelle zu verfolgen. Ein *in vivo* Test würde vor allem die Untersuchung von Mutanten erleichtern, da eine Expression und Reinigung der Proteine nicht mehr nötig wäre. Die im Folgenden aufgeführten Daten könnten die Grundlage für die Entwicklung eines *in vivo* Testsystems in *S. cerevisiae* liefern:

In *S. cerevisiae* konnte von Mollaaghababa und Mitarbeitern (1996) Rinderopsin exprimiert, und mit 11-*cis*-Retinal zu funktionellem Rhodopsin rekonstituiert werden. Shi und Mitarbeiter (1998) charakterisierten eine Rhodopsin-Mutante (R135A), die in Abwesenheit von 11-*cis*-Retinal phosphoryliert wird, und Arrestin binden kann. Dieses Protein könnte als konstitutiv aktiver Rezeptor eingesetzt werden. Als Ersatz für die Rhodopsinkinase könnte Protein Kinase C dienen. Dieses Enzym kann ebenso wie die Rhodopsin Kinase den



C-Terminus von Rhodopsin phosphorylieren (Newton & Williams, 1993). Auch in *S. cerevisiae* existiert eine Protein Kinase C (PKC1), welche homologe Substratspezifität zu der aus Säugern besitzt (Watanabe et al., 1994). Unter Verwendung der Rhodopsin-R135A Mutante als konstitutiv aktiver Rezeptor sind verschiedene Wege möglich. Zum einen bietet z.B. das neue CytoTrap™ 2-Hybrid-System (Stratagene) nun die Möglichkeit die Interaktion von Proteinen im Cytoplasma zu untersuchen (Chang et al., 1998). Ein weiterer Weg wäre die Nutzung des von Broach & Thorner (1996) beschriebenen Testsystems, das auf dem Hefe-Signaltransduktionsweg beruht, der zum Wachstums-Stillstand haploider  $\alpha$ -Zellen nach Zugabe des  $\alpha$ -Faktors führt (Heim & Fürst, 1997). Mit diesem System konnte bereits die Wechselwirkung des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors mit seinem G-Protein untersucht werden (Jeansonne, 1994; King et al., 1990).

Die Etablierung eines *in vivo* Systems in *S. cerevisiae* könnte für die Untersuchung von humanen Arrestin- und Rhodopsin-Mutanten einen wesentlichen Beitrag leisten.

#### **4.2.6. Kristallisation der rekombinanten Arrestine, Untersuchung mit kristallographischen Methoden und Interpretation der Daten**

Die rekombinanten Arrestine MRGS-6His-Arrestin, Arrestin-6His sowie Arrestin-StrepTagII konnten unter den Bedingungen für natives Arrestin (Wilden et al., 1997) kristallisiert werden. Durch den Einsatz der rekombinanten Proteine größerer Homogenität konnte die Kristallisation vereinfacht und wesentlich verkürzt werden (3 Tage anstelle von 4 Wochen; 2.15.). Die Kristalle der rekombinanten Arrestine zeigten die gleiche Morphologie und die gleiche orthorhombische Raumgruppe ( $P2_12_12$ ) wie die Kristalle des nativen, retinalen Arrestins. Die Gitterkonstanten weichen nur gering voneinander und denen der Kristalle von retinalem Arrestin ab (3.8.1., Tab. 3.8.; Granzin et al., 1998). Diese kristallographischen Daten legen den Schluß nahe, daß durch die zusätzlichen Aminosäuren am N- oder C-Terminus (6 Histidine bzw. StrepTagII) keine Veränderungen in der Molekülpackung auftreten.

Über die Faltung des C-Terminus (AS 368-404) konnten in dieser Arbeit keine neuen Erkenntnisse gewonnen werden. Zwar hat Platin an Arrestin gebunden, die Platin-Positionen sind aber allesamt in der N-terminalen Domäne lokalisiert. Da der C-Terminus entsprechend zum retinalen Arrestin hohe Flexibilität zeigt, ist es möglich, daß auch an den 6 C-terminal angehängten Histidinen Platin gebunden hat. Aufgrund der Flexibilität sind diese wie der restliche C-Terminus mit kristallographischen Methoden nicht sichtbar.

Durch Tränken von Arrestin-6His Kristallen konnten verschiedene Platinderivate hergestellt werden (3.8.2., Tab. 3.9.), wobei bisher das "PIP"-Derivat zu einer Auflösung von 4,15 Å am Synchrotron (Daresbury, U.K.) vermessen wurde. Die Auswertung dieser Daten ergibt die gleiche Raumanordnung von Arrestin-6His wie für das native Arrestin. Für Arrestin-6His ist

anzunehmen, daß dieses Protein 100 %ig in der postulierten inaktiven Form vorliegt. Daher werden diese Daten dahingehend interpretiert, daß es sich bei den Unterschieden im Loop-Bereich (AS 68 bis 78) (1.5.) nur um Packungseffekte durch die Kristallisation handelt. Die Resultate der vorliegenden Arbeit stimmen in diesem entscheidenden Punkt mit den von Hirsch und Mitarbeitern (1999) gezeigten Ergebnissen überein: Die Moleküle A und B der asymmetrischen Einheit befinden sich jeweils in der inaktiven Konformation.

Kurz vor der schriftlichen Vollendung dieser Arbeit wurde von Hirsch und Mitarbeitern (1999) eine verfeinerte Röntgenstruktur von rekombinantem Arrestin aus *E. coli* präsentiert. An dieser Stelle werden die wichtigsten Ergebnisse kurz im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit diskutiert:

Hirsch und Mitarbeiter (1999) fanden in ihrer Röntgenstruktur ebenfalls die von Granzin und Mitarbeitern (1998) beschriebenen Moleküle A und B. Durch Ausbildung von intermolekularen  $\beta$ -Faltblattstrukturen sind jeweils ein Molekül A und B in der asymmetrischen Einheit verbunden (Granzin et al., 1998, Hirsch et al., 1999). Dies wird von Hirsch und Mitarbeitern als funktionelles Heterodimer interpretiert, dessen biologische Relevanz und Existenz bisher nicht erwiesen ist. Es wird angenommen, daß dieses Dimer zur Stabilisierung der inaktiven Konformation von Arrestin in Lösung beiträgt (Hirsch et al., 1999). Das postulierte Dimer wurde von Schubert und Mitarbeitern (in Druck) durch Ultrazentrifugationsversuche gefunden, dies ist konsistent mit Daten von Wacker (Wacker et al., 1977). Gegen die Existenz eines Heterodimers in Lösung spricht jedoch die Tatsache, daß Arrestin nach Gelfiltrationschromatographien stets als Monomer nachzuweisen ist (Broekhuysse & Bessems, 1985). Hirsch und Mitarbeiter (1999) fanden den C-Terminus von Arrestin übereinstimmend mit den Literaturdaten (4.2.4., 1.4.2.) in Kontakt mit dem N-Terminus. Untersuchungen von Vichnivetzkij und Mitarbeitern (1999) postulieren im Zusammenhang zur Struktur von Hirsch und Mitarbeitern (1999) eine Interaktion der Aminosäuren Phe 375, Phe 377 und Phe 380 (C-terminales Ende) mit den Aminosäuren 11 bis 13 des N-Terminus. Auch Hirsch und Mitarbeiter (1999) konnten für diejenigen Bereiche des C-Terminus keine exakten Daten erhalten, welche nicht in Kontakt mit dem Arrestinmolekül treten (Aminosäuren 363 bis 371 sowie 395 bis 404). Diese Bereiche sind stark fehlgeordnet und bedürfen weiterhin der Aufklärung der exakten Raumposition. Dazu könnten die in dieser vorliegenden Arbeit erstellten Arrestinderivate herangezogen werden. Neben Arrestin-6His bietet auch die Kristallisation und Aufklärung der Röntgenraumstruktur des Arrestin-GST Fusionsproteins eine zusätzliche Möglichkeit die dreidimensionale Anordnung des C-Terminus von Arrestin vollständig aufzuklären.

## 5. Zusammenfassung

Arrestin ist eine entscheidende Komponente in der Abschaltung und Regulation der lichtinduzierten Signalkaskade. Nach Phosphorylierung des lichtaktivierten Rhodopsins (P-R\*) durch die Rhodopsinkinase kann Arrestin binden und eine Interaktion von P-R\* mit dem G-Protein Transducin verhindern.

In dieser Arbeit wurde ein heterologes Expressionssystem für Arrestin aus Stäbchen des Rinderauges entwickelt. Verschiedene Versuche wildtypisches Arrestin in *E. coli* zu exprimieren und zu reinigen waren nicht erfolgreich. Das prokaryotisch erzeugte Protein wies nur geringe Stabilität in Lösung auf. In *S. cerevisiae* exprimiertes Arrestin stimmt in seinen biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften mit dem Protein aus Retinae überein. Im SDS-Gel läuft retinales Arrestin als Doppelbande bei etwa 54 kDa, wobei N- oder C-terminale Modifikationen der rekombinanten Proteine (MRGS-6His, 6His, StrepTagII, GST) eine Verschiebung zu höheren Molekulargewichten bewirken. Nach Isoelektrischer Fokussierung zeigen die rekombinanten Arrestine größere Homogenität als das retinale Protein. In Abhängigkeit von der Modifikation verschiebt sich der Isoelektrische Punkt leicht zu niedrigerem pH-Wert. Massenspektrometrische Untersuchungen und N-terminale Proteinsequenzierung (Edmann-Abbau) ergaben, daß entsprechend dem retinalen Protein 3 bis 4 Aminosäuren des Aminoendes fehlen können. Bindungsstudien mit *in vitro* phosphoryliertem Rhodopsin (PMBs) beweisen lichtabhängige Bindung der rekombinanten Arrestine an P-R\*. Die verschiedenen, erzeugten N- oder C-terminalen Modifikationen scheinen keinen Einfluß auf Bindung bzw. Spezifität zu nehmen. Die Fusionsproteine Arrestin-GST und GST-Arrestin binden ebenfalls an P-R\*, dies deutet darauf hin, daß die postulierte Konformationsänderung von einer inaktiven in eine bindende Form von Arrestin nur durch kleine Bewegung des N- und C-Terminus erfolgen kann. Zur Eingrenzung der Interaktionsbereiche zwischen Arrestin und Rhodopsin mittels sterischer Hinderung, wurden in putative Bindungsdomänen Cysteine eingeführt, welche zur Kopplung großer Moleküle (Biotin, Fluorescein) dienen werden. Es konnte bisher die Mutante Arrestin-V244C-6His isoliert und untersucht werden. Sie entspricht in ihrem Bindungsverhalten an PMBs dem nativen Arrestin. Die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse von rekombinantem Arrestin-6His zeigt im Vergleich zum retinalen Arrestin Identität in Bezug auf Raumgruppe und Gitterkonstanten. Rekombinantes und retinales Arrestin haben eine analoge Packung im Kristall, es werden die gleichen Differenzen zwischen den Molekülen A und B der asymmetrischen Einheit festgestellt. Mit großer Sicherheit kann ausgeschlossen werden, daß verschiedene Bindungsformen (aktiv, inaktiv) von Arrestin im Kristall vorliegen. Der C-Terminus zeigt identisch zum retinalen Arrestin hohe Flexibilität und ist in der Elektronendichtekarte nicht sichtbar.

## 6. Literaturverzeichnis

- Acharya, S., Saad, Y., Karnik, S.S. (1997). Transducin- $\alpha$  C-terminal peptide binding site consists of C-D and E-F loops of rhodopsin. *J Biol Chem* 272, 6519-6524.
- Amrein, K.E., Takacs, B., Steiger, M., Molnos, J., Flint, N.A., Burn, P., (1995). Purification and characterization of recombinant human p50csk protein-tyrosin kinase from an *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial chaperones GroES and GroEL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1048-1052.
- Armstrong, K.A., Som, T., Volkert, F.C., Rose, A., Broach, J.R. (1989). (In: Yeast Genetic Engineering. /P.J. Barr, A.J. Brake, P. Valenzuela, eds.) p. 165. Butterworth, Stoneham, Massachusetts
- Arnis, S. & Hofmann, K.P. (1993). Two different forms of metarhodopsin II: Schiff base deprotonation precedes proton uptake and signaling state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7849-7853.
- Arnis, S. & Hofmann, K.P. (1995). Photoregeneration of bovine rhodopsin from its signaling state. *Biochemistry* 34, 9333-9340.
- Arshavsky, V.Yu., Antoch, M.P., Lukjanov, K.A., Philippov, P.P. (1989). Transducin GTPase provides for rapid quenching of the cGMP cascade in rod outer segments. *FEBS Lett* 250, 353-356.
- Attwood, T.K., Avison, H., Beck, M.E., Bewley, M., Bleasby, A.J., Brewster, F., Cooper, P., Degtyarenko, K., Geddes, A.J., Flower, D.R., Kelly, M.P., Lott, S., Measures, K.M., Parry-Smith, D.J., Perkins, D.N., Scordis, P., Scott, D., Worledge, C. (1997). The PRINTS database of protein fingerprints: a novel information resource for computational molecular biology. *J Chem Inf Comput Sci* 37, 417-424.
- Azarian, S.M., King, A.J., Hallett, M.A., Williams, D.S. (1995). Selective proteolysis of arrestin by calpain. Molecular characteristics and its effect on rhodopsin dephosphorylation. *J Biol Chem* 270, 24375-24384.
- Baehr, W., Devlin, M.J., Applebury, M.L. (1979). Isolation and characterization of cGMP phosphodiesterase from bovine rod outer segments. *J Biol Chem* 254, 11699-11777.
- Baldari, C., Murray, J.A., Ghiara, P., Cesareni, G., Galeotti, C.L. (1987). A novel leader peptide which allows efficient secretion of a fragment of human interleukin 1 beta in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 6, 229-234.
- Banga, J.P., Suleyman, S., Kasp, E., Brown, E., LeRoy, F., Sanders, M., Dumonde, D. (1987). Immunoaffinity purification of S-antigen using monoclonal antibodies to different antigenic sites. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28, 604-607.
- Barak, L.S., Ferguson, S.S., Zhang, J., Caron, M.G. (1997). A beta-arrestin/green fluorescent protein biosensor for detecting G protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem* 272, 497-500.
- Barak, L.S., Warabi, K., Feng, X., Caron, M.G., Kwatra, M.M. (1999). Real-time visualization of the cellular redistribution of G protein-coupled receptor kinase 2 and beta-arrestin 2 during homologous desensitization of the substance P receptor. *J Biol Chem* 274, 7565-7569.
- Baylor, D.A., Lamb, T.D., Yau, K.W. (1979). Responses of retinal rods to single photons. *J Physiol (Lond)* 288, 613-634.

- Beck, S. & Pohl, F.M. (1984). DNA Sequencing with direct blotting electrophoresis, *EMBO J* 3, 2905
- Bennett, N., Michel-Villaz, M., Kühn, H. (1982). Light-induced interaction between rhodopsin and the GTP-binding protein. Metarhodopsin II is the major photoproduct involved. *Eur J Biochem* 127, 97-103.
- Bernstein, P.S., Law, W.C., Rando, R.R. (1987). Isomerization of all-*trans*-retinoids to 11-*cis*-retinoids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 1849-1853.
- Bielka, H. & Börner, T. (1995). Rezeptorvermittelte Signalübertragungen (In: Molekulare Biologie der Zelle, Gustav Fischer Verlag
- Blake, M.S., Johnston, K.H., Russel-Jones, G.J., Gotschlich, E.C. (1984). A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem* 136, 175-179.
- Bliziotis, M., Murtagh, J., Wiren, K. (1996). Beta-adrenergic receptor kinase-like activity and beta-arrestin are expressed in osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 11, 820-826.
- Blum, P., Velligan, M., Lin, N., Matin, A. (1992). Dnak-mediated alternations in human growth hormone protein inclusion bodies. *Bio/Technology* 10, 301-304.
- Blundell, T.L. & Johnson, L.N. (1976). Protein crystallography. Academic Press, New York
- Borthwick, G.M. & Forrester, J.V. (1983). Purification of retinal S-antigen by ion-exchange chromatography and chromatofocusing. *Exp Eye Res* 37, 613-625.
- Bowie, J.U., Luthy, R., Eisenberg, D. (1991). A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* 253, 164-170.
- Bownds, D., Dawes, J., Miller, J., Stahlman, M. (1972). Phosphorylation of frog photoreceptor membranes induced by light. *Nat New Biol* 237, 125-127.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brake, A.J., Merryweather, J.P., Coit, D.G., Heberlein, U.A., Masiarz, F.R., Mullenbach, G.T., Urdea, M.S., Valenzuela, P., Barr, P.J. (1984). Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 4642-4646.
- Breitman, M.L., Tsuda, M., Usukura, J., Kikuchi, T., Zucconi, A., Khoo, W., Shinohara, T. (1991). Expression of S-antigen in retina, pineal gland, lens and brain is directed by 5'-flanking sequences. *J Biol Chem* 266, 15505-15510.
- Broach, J.R., Thorner, J. (1996). High-throughput screening for drug discovery. *Nature* 7, 14-16.
- Broekhuysse, R.M. & Bessems, H.J. (1985). The molecular weight of bovine retinal S-antigen. *Exp Eye Res* 40, 763-766.
- Brown, N.G., Fowles, C., Sharma, R., Akhtar, M. (1992). Mechanistic studies on rhodopsin kinase. Light-dependent phosphorylation of C-terminal peptides of rhodopsin. *Eur J Biochem* 208, 659-667.
- Bruckert, F., Chabre, M., Vuong, T.M. (1992). Kinetic analysis of the activation of transducin by photoexcited rhodopsin. Influence of the lateral diffusion of transducin and competition of guanosine diphosphate and guanosine triphosphate rhodopsin. *Biochem Cell Biol* 71, 57-64.

- Buczylko, J. & Palczewski, K. (1993). Purification of arrestin from bovine retinas. *Methods Neurosci* 15, 226-236.
- Chang, C., Callahan, M., Mullinax, R.L., Sanchez, T., Dewar, C., Davis, H., Hexdall, L., Greener, A. (1998). New CytoTrap two-hybrid system detects protein-protein interactions. *Strategies* 11, 65-68.
- Crick, F.H.C. & Magdoff, B.S. (1956). The theory of the method of isomorphous replacement for protein crystals. *Acta Cryst* 9, 901
- Daemen, F.J. (1973). Vertebrate rod outer segment membranes. *Biochim Biophys Acta* 300, 255-288.
- Dawis, S.M., Graeff, R.M., Heyman, R.A., Walseth, T.F., Goldberg, N.D. (1988). Regulation of cyclic GMP metabolism in toad photoreceptors. Definition of the metabolic events subserving photoexcited and attenuated states. *J Biol Chem* 263, 8771-8785.
- Dean, K.R. & Akhtar, M. (1996). Novel mechanism for the activation of rhodopsin kinase: Implications for other G protein-coupled receptor kinases (GRK's). *Biochemistry* 35, 6164-6172.
- De Baetselier, A., Vasavada, A., Dohet, P., Ha-Thi, V., De Beukelaer, M., Erpicum, T., De Clerk, L., Hanotier, J., Rosenberg, S. (1991). Fermentation of a yeast producing *A. niger* glucose oxidase: Scale-up, purification and characterization of the recombinant enzyme. *Biotechnology* 9, 559-561.
- Deterre, P., Bigay, J., Forquet, F., Robert, M., Chabre, M. (1988). cGMP phosphodiesterase of retinal rods is regulated by two inhibitory subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2424-2428.
- Deterre, P., Bigay, J., Robert, M., Pfister, C., Kühn, H., Chabre, M. (1986). Activation of retinal rod cyclic GMP-phosphodiesterase by transducin: Characterization of the complex formed by phosphodiesterase inhibitor and transducin alpha-subunit. *Proteins* 1, 188-193.
- Dhanabal, M., Ramchandran, R., Volk, R., Stillman, I.E., Lombardo, M., Iruela-Arispe, M.L., Simons, M., Sukhatme, V.P. (1999). Endostatin: yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 59, 189-197.
- Dohlman, H.G., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1987). Structure and function of the beta 2-adrenergic receptor-homology with rhodopsin. *Kidney Int Suppl* 23, S2
- Donnelly, D., Johnson, M.S., Blundell, T.L., Saunders, J. (1989). An analysis of the periodicity of conserved residues in sequence alignments of G-protein coupled receptors. Implications for the three-dimensional structure. *FEBS Lett* 251, 109-116.
- Donoso, L.A., Merryman, C.F., Edelberg, K., Nais, R., Kalsow, C. (1985). S-antigen in the developing retina and pineal gland: A monoclonal antibody study. *Invest Ophthalmol Vis Science* 26, 569-571.
- Donoso, L.A., Gregerson, D.S., Smith, L., Vrabec, T., Kalsow, C.M. (1990). S-antigen: Preparation and characterization of site specific monoclonal antibodies. *Current Eye Research* 9, 343-361.
- Dorey, C., Tuyen, V.V., Cozette, J., Faure, J.P. (1979). Isolation and properties of retinal S antigen. *Immunol and Immunopathol of the eye*. 17, 110-112.
- Dorey, C., Cozette, J., Faure, J.P. (1982). A simple and rapid method for isolation of retinal S antigen. *Ophthalmic Res* 14, 249-255.

- Dorey, M., Hargrave, P.A., McDowell, J.H., Arendt, A., Vogt, T., Bhawar, N., Albert, A.D., Yeagle, P.L. (1999). Effects of phosphorylation on the structure of the G-protein receptor rhodopsin. *Biochim Biophys Acta* 1416, 217-224.
- Dratz, E.A., Lewis, J.W., Schaechter, L.E., Parker, K.R., Kliger, D.S. (1987). Retinal rod GTPase turnover rate increases with concentration: A key to the control of visual excitation? *Biochem Biophys Res Commun* 146, 379-386.
- Dublié, S. (1997). Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination. *Methods Enzymol* 276, 523-530.
- Emeis, D. & Hofmann, K.P. (1981). Shift in the relation between flash-induced metarhodopsin I and metarhodopsin II within the first 10% rhodopsin bleaching in bovine disc membranes. *FEBS Lett* 136, 201-207.
- Emeis, D., Kühn, H., Reichert, J., Hofmann, K.P. (1982). Complex formation between metarhodopsin II and GTP-binding protein in bovine photoreceptor membranes leads to a shift of the photoproduct equilibrium. *FEBS Lett* 143, 29-34.
- Emr, S.D. (1990). Heterologous gene expression in yeast. *Methods Enzymol* 185, 231-233.
- Erhard, E. & Hollenberg, C.P. (1983). The presence of a defective LEU2 gene on 2  $\mu$  DNA recombinant plasmids of *Saccharomyces cerevisiae* is responsible for curing and high copy number. *J Bacteriol* 156, 625-635.
- Etcheverry, T. (1990). Induced expression using yeast copper metallothionein promoter. *Methods Enzymol* 185, 319-329.
- Evans, C.F., Engelke, D.R., Thiele, D.J., (1990). ACE1 transcription factor produced in *Escherichia coli* binds multiple regions within yeast metallothionein upstream activation sequences. *Mol. Cell Biol* 10, 426-429.
- Fágáin, C.Ó. (1997). Stabilizing protein function. Springer Verlag
- Farabaugh, P.J. (1978). Sequence of the *lacI* gene. *Nature* 274, 765-769.
- Faure, J.P., Mirshahi, M., Dorey, C., Thillaye, B., de Kozak, Y., Boucheix, C. (1984). Production and specificity of monoclonal antibodies to retinal S antigen. *Curr Eye Res* 3, 867-872.
- Felber, S., Breuer, H.P., Petruccione, F., Honerkamp, J., Hofmann, K.P. (1996). Stochastic simulation of the transducin GTPase cycle. *Biophys J* 71, 3051-3063.
- Ferguson, S.S., Downey, W.E., Colapietro, A.M., Barak, L.S., Menard, L., Caron, M.G. (1996). Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* 271, 363-366.
- Ferguson, S.S. & Caron, M.G. (1998). G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Semin Cell Dev Biol* 9, 119-127.
- Fischer, T. (1997). Untersuchungen zur Reinigung von Arrestin aus Retinen von Rinderaugen und zur Identifizierung der Bindungsstellen im Arrestin/P-Rhodopsin-Komplex. Dissertation
- Fleer, R. (1992). Engineering yeast for high level expression. *Curr Opin Biotechnol* 3, 486-496.
- Fowles, C., Akhtar, M., Cohen, P. (1989). Interplay of phosphorylation and dephosphorylation in vision: Protein phosphatases of bovine rod outer segments. *Biochemistry* 28, 9385-9391.

- Franke, R.R., Sakmar, T.P., Graham, R.M., Khorana, H.G. (1992). Structure and function in rhodopsin. Studies of the interaction between the rhodopsin cytoplasmic domain and transducin. *J Biol Chem* 267, 14767-14774.
- Fuchs, S., Nakazawa, M., Maw, M., Tamai, M., Oguchi, Y., Gal, A. (1995). A homozygous 1-base pair deletion in the arrestin gene is a frequent cause of Oguchi disease in Japanese. *Nat Genet* 10, 360-362.
- Fukuda, M.N., Papermaster, D.S., Hargrave, P.A. (1979). Rhodopsin carbohydrate. Structure of small oligosaccharides attached at two sites near the NH2 terminus. *J Biol Chem* 254, 8201-8207.
- Fung, B.K., Hurley, J.B., Stryer, L. (1981). Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 152-156.
- Fung, B.K. (1983). Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. I. Separation and reconstitution of the subunits. *J Biol Chem* 258, 10495-10502.
- Fürst, P., Hu, S., Hackett, R., Hamer, D., (1988). Copper activates metallothionein gene transcription by altering the conformation of a specific DNA binding protein. *Cell* 55, 705-717.
- Futcher, A.B. & Cox, B.S. (1984). Copy number and the stability of 2-micron circle-based artificial plasmids of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 157, 283-290.
- Gaidarov, I., Krupnick, J.G., Falck, J.R., Benovic, J.L., Keen, J.H. (1999). Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding [In Process Citation]. *EMBO J* 18, 871-881.
- Garcia-Quintana, D., Garriga, P., Manyosa, J. (1992). Study of the structure of arrestin (S-antigen) from bovine photoreceptors by FTIR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1122, 269-272.
- Gekko, K. & Timasheff, S.N. (1981). Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol. *Biochemistry* 20, 4677-4686.
- Georgopoulos, C. & Welch, W.J. (1993). Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol*, 9, 601-634.
- Gething, M.J. & Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature*, 355, 33-45.
- Gibson, S.K., Parkes, J.H., Liebman, P.A. (1998). Phosphorylation stabilizes the active conformation of rhodopsin. *Biochemistry* 37, 13910
- Gietz, R. D. & Sugino, A. (1989). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74, 527-534.
- Giniger E., Varnum S.M., Ptashne M. (1985). Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* 40, 767-774.
- Goodman, O.B.J., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V.V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H., Benovic, J.L. (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2- adrenergic receptor. *Nature* 383, 447-450.
- Gough, J. & Murray, N. (1983). Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J. Mol. Biol.* 166, 1-19.
- Granzin, J., Wilden, U., Choe, H.W., Labahn, J., Krafft, B., Büldt, G. (1998). X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments. *Nature* 391, 918-921.



- Gray-Keller, M.P., Detwiler, P.B., Benovic, J.L., Gurevich, V.V. (1997). Arrestin with a single amino acid substitution quenches light-activated rhodopsin in a phosphorylation-independent fashion. *Biochemistry* 36, 7058-7063.
- Gregerson, D.S., Fling, S.P., Merryman, C.F., Donoso, L.A. (1989). Properties of antibody epitopes in an immunopathogenic autoantigen: Evidence that retinal S-antigen is recognized as a foreign antigen. *J Neuroimmunol* 24, 191-206.
- Guarente, L. & Ptashne, M. (1981). Fusion of *Escherichia coli* lacZ to the cytochrome c gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 2199-2203.
- Guergova-Kuras, M., Salcedo-Hernandez, R., Bechmann, G., Kuras, R., Gennis, R.B., Crofts, A.R. (1999). Expression and one-step purification of a fully active polyhistidine-tagged cytochrome bcl complex from *Rhodobacter sphaeroides*. *Protein Expr and Purif* 15, 370-380.
- Gurevich, V.V. & Benovic, J.L. (1992). Cell-free expression of visual arrestin. Truncation mutagenesis identifies multiple domains involved in rhodopsin interaction. *J Biol Chem* 267, 21919-21923.
- Gurevich, V.V. & Benovic, J.L. (1993a). Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin. *J Biol Chem* 268, 11628-11638.
- Gurevich, V.V., Richardson, R.M., Kim, C.M., Hosey, M.M., Benovic, J.L. (1993b). Binding of wild type and chimeric arrestins to the m2 muscarinic cholinergic receptor. *J Biol Chem* 268, 16879-16882.
- Gurevich, V.V., Chen, C.Y., Kim, C.M., Benovic, J.L. (1994). Visual arrestin binding to rhodopsin. Intramolecular interaction between the basic N terminus and acidic C terminus of arrestin may regulate binding selectivity. *J Biol Chem* 269, 8721-8727.
- Gurevich, V.V., Dion, S.B., Onorato, J.J., Ptasienski, J., Kim, C.M., Sterne-Marr, R., Hosey, M.M., Benovic, J.L. (1995). Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* 270, 720-731.
- Gurevich, V.V. & Benovic, J.L. (1995). Visual arrestin binding to rhodopsin. Diverse functional roles of positively charged residues within the phosphorylation-recognition region of arrestin. *J Biol Chem* 270, 6010-6016.
- Gurevich, V.V., Pals-Rylaarsdam, R., Benovic, J.L., Hosey, M.M., Onorato, J.J. (1997). Agonist-receptor-arrestin, an alternative ternary complex with high agonist affinity. *J Biol Chem* 272, 28849-28852.
- Gurevich, V.V. & Benovic, J.L. (1997). Mechanism of phosphorylation-recognition by visual arrestin and the transition of arrestin into a high affinity binding state. *Mol Pharmacol* 51, 161-169.
- Gurevich, V.V. (1998). The selectivity of visual arrestin for light-activated phosphorhodopsin is controlled by multiple nonredundant mechanisms. *J Biol Chem* 273, 15501-15506.
- Haase-Pettingell & King, (1988). Formation of aggregates from a thermolabile *in vivo* folding intermediate in P22 tailspike maturation: A model for inclusion body formation. *J Biol Chem* 263, 4977-4983.
- Hamer, D., (1986). Metallothionein *Ann Rev Biochem* 55, 913-951.
- Hamer, D., Thiele, D.J., Lemontt, J.E., (1985). Function and autoregulation of yeast copperthionein. *Science* 228, 685-690.

- Hamm, H.E., Deretic, D., Arendt, A., Hargrave, P.A., Koenig, B., Hofmann, K.P. (1988). Site of G protein binding to rhodopsin mapped with synthetic peptides from the alpha subunit. *Science* 241, 832-835.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. (In: Rickwood D., Hames B.D. DNA cloning, a practical approach, IRL Press, 1, 109-135.
- Hargrave, P.A., Hamm, H.E., Hofmann, K.P. (1993). Interaction of rhodopsin with the G-protein, transducin. *Bioessays* 15, 43-50.
- Hargrave, P.A. & Hamm, H.E. (1994). Regulation of visual transduction, 25-67 (In: Sibley D.R. & Houslay M.D. Regulation of cellular signal transduction pathways by desensitisation and amplification. John Wiley & Sons Ltd)
- Heim, J. & Fürst, P. (1997). Molekulare Screening Plattformen – ein Blick in die Zukunft. *BIOforum* 11, 597-602.
- Hirsch, J.A., Schubert, C., Gurevich, V.V., Sigler, P.B. (1999). The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: A model for arrestin's regulation. *Cell* 97, 257-269.
- Hockney, R.C., (1995). Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Trends Biotech* 13, 456-463.
- Hofmann, K.P. (1986). Photoproducts of rhodopsin in the disk membrane. *Photochem. Photobiophys* 13, 309-327.
- Hofmann, K.P., Pulvermuller, A., Buczylo, J., Van Hooser, P., Palczewski, K. (1992). The role of arrestin and retinoids in the regeneration pathway of rhodopsin. *J Biol Chem* 267, 15701-15706.
- Hofmann, K.P. & Heck, M. (1996). Light induced protein-protein interactions on the rod photoreceptor disc membrane. *Biomembranes* 2, 1-100.
- Hope, H., Frolow, F., von Böhlen, K., Makowski, I., Kratky, C., Halfon, Y., Danz, H., Webster, P., Bartels, K.S., Wittmann, H.G., Yonath, A. (1989). Cryocrystallography of ribosomal particles. *Acta Cryst* 45, 190
- Hopper, J.E., Broach, J.R., Rowe, L.B. (1978). Regulation of the galactose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: Induction of uridyl transferase mRNA and dependency on GAL4 gene function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 2878-2882.
- Hurley, J.B. & Stryer, L. (1982). Purification and characterization of the gamma regulatory subunit of the cyclic GMP phosphodiesterase from retinal rod outer segments. *J Biol Chem* 257, 11094-11099.
- Jäger, S., Palczewski, K., Hofmann, K.P. (1996). Opsin/all-trans-retinal complex activates transducin by different mechanisms than photolyzed rhodopsin. *Biochemistry* 35, 2901-2908.
- Janknecht, R., De Martynhoff, G., Lou, J., Hipkind, R.A., Nordheim, A., Stunnenberg, H.G. (1991). Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8972-8976.
- Jayaram, M., Li, Y.-Y., Broach, J.R. (1983). The yeast plasmid 2mu circle encodes components required for its high copy propagation. *Cell* 34, 95-104.

- Jeansonne, N.E., Jazwinski, S.M., Donoso, L.A. (1991). A 48-kDa, S-antigen-like phosphoprotein in yeast DNA-replicative complex preparations. *J Biol Chem* 266, 14675-14680.
- Jeansonne, N.E. (1994). Yeast as a model system for mammalian seven-transmembrane segment receptors. *Proc Soc Exp Biol Med* 206, 35-44.
- Johnston, S.A., Salmeron, J.M. Jr, Dincher, S.S. (1987). Interaction of positive and negative regulatory proteins in the galactose regulon of yeast. *Cell* 50, 143-146.
- Johnston, M. (1987). A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 51, 458-476.
- Jones, E.W. (1983). In: *Yeast Genetics* (Spencer, J.F.T., Spencer D.M. Smith A.R.W., eds.), Springer-Verlag, New York
- Jones, E.W. (1990). Vacuolar Proteases in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol*, 185, 372-386.
- Jones, E. W. (1991). Tackling the Protease Problem in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 194, 428-453.
- Jones, G.J., Crouch, R.K., Wiggert, B., Cornwall, M.C., Chader, G.J. (1989). Retinoid requirements for recovery of sensitivity after visual-pigment bleaching in isolated photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9606-9610.
- Kahlert, M. & Hofmann, K.P. (1991). Reaction rate and collisional efficiency of the rhodopsin-transducin system in intact retinal rods. *Biophys J* 59, 375-386.
- Kalsow, C.M., Wacker, W.B. (1978). Pineal gland involvement in retina-induced experimental allergic uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17, 774-783.
- Kasp, E., Banga, J.P., Brown, E.C., Wicking, J.M., Suleyman, S., Ellis, B.A., Sanders, M.D., Dumonde, D.C. (1987). An improved method for the purification of retinal S-antigen using selective hydrophobic adsorption chromatography. *J Immunol Methods* 100, 147-152.
- Kendall, R.L., Yamada, R., Bradshaw, R.A. (1990). Cotranslational amino-terminal Processing. *Methods Enzymol* 185, 398-407.
- Khyse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth* 10, 203-209.
- Kibelbek, J., Mitchell, D.C., Beach, J.M., Litman, B.J. (1991). Functional equivalence of metarhodopsin II and the Gt-activating form of photolyzed bovine rhodopsin. *Biochemistry* 30, 6761-6768.
- Kieselbach, T., Irrgang, K.D., Rüppel, H. (1994). A segment corresponding to amino acids Val170-Arg182 of bovine arrestin is capable of binding to phosphorylated rhodopsin. *Eur J Biochem* 226, 87-97.
- King, K., Dohlman, H.G., Thorner, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1990). Control of yeast mating signal transduction by a mammalian beta 2-adrenergic receptor and Gs alpha subunit. *Science* 250, 121-123.
- Kinney, M.S., Fisher, S.K. (1978). The photoreceptors and pigment epithelium of the larval *Xenopus* retina: morphogenesis and outer segment renewal. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 201, 149-167.

- Knospe, V.K., Donoso, L.A., Banga, J.P., Kasp, K., Gregerson, D.S. (1988). Epitope mapping of bovine retinal S-antigen with monoclonal antibodies. *Curr Eye Res* 7, 1137-1147.
- Knospe, V.K., Gregerson, D.S., Donoso, L.A. (1989). Identification of the main immunogenic regions of retinal S-antigen by analysis of species and strain similarities in the specificity of antibody responses. *Autoimmunity* 4, 153-169.
- König, B., Arendt, A., McDowell, J.H., Kahlert, M., Hargrave, P.A., Hofmann, K.P. (1989). Three cytoplasmic loops of rhodopsin interact with transducin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6878-6882.
- Kopetzki, E., Schumacher, G., Buckel, P. (1989). Control of formation of active soluble or inactive insoluble baker's yeast alpha-glucosidase PI in *Escherichia coli* by induction and growth conditions. *Mol Gen Genet* 216, 149
- Krueger, J.K., Stock, A.M., Schutt, C.E. Stock, J. (1990). (In: Protein Folding: Deciphering the Second Half of the Genetic Code. Gierasch, L.M. King, J. American Association for the Advancement of Science, Washington D.C. ) 136-142.
- Krupnick, J.G., Gurevich, V.V., Schepers, T., Hamm, H.E., Benovic, J.L. (1994). Arrestin-rhodopsin interaction. Multi-site binding delineated by peptide inhibition. *J Biol Chem* 269, 3226-3232.
- Krupnick, J.G., Gurevich, V.V., Benovic, J.L. (1997). Mechanism of quenching of phototransduction. Binding competition between arrestin and transducin for phosphorhodopsin. *J Biol Chem* 272, 18125-18131.
- Krupnick, J.G. & Benovic, J.L. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38, 289-319.
- Kühn, H. & Dreyer, W.J. (1972). Light-dependent phosphorylation of rhodopsin by ATP. *FEBS Lett* 20, 1-6.
- Kühn, H., Cook, J.H., Dreyer, W.J. (1973). Phosphorylation of rhodopsin in bovine photoreceptor membranes. A dark reaction after illumination. *Biochemistry* 12, 2495-2502.
- Kühn, H. (1978) Light-regulated binding of rhodopsin kinase and other proteins to cattle photoreceptor membranes. *Biochemistry* 17, 4389-4395.
- Kühn, H. (1980). Light- and GTP-regulated interaction of GTPase and other proteins with bovine photoreceptor membranes. *Nature* 283, 587-589.
- Kühn, H., Hall, S.W., Wilden, U. (1984). Light-induced binding of 48-kDa protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin. *FEBS Lett* 176, 473-478.
- Kühn, H. & Wilden, U. (1987). Deactivation of photoactivated rhodopsin by rhodopsin kinase and arrestin. *J Recept Res* 7, 283-298.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lang-Hinrichs, C., Queck, I., Büldt, G., Stahl, U., Hildebrandt, V. (1994). The archaeobacterial membrane protein bacterio-opsin is expressed and N-terminally processed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 244, 183-188.
- Lanfermeijer, F.C., Venema, K. Palmgreen, M.G. (1998). Purification of a histidine-tagged plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase expressed in yeast. *Protein Expression and Purification* 12, 29-37.

- La Vallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant K.L., Schendel P.F. McCoy J.M. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Bio/Technology* 11, 187-193.
- Lem, J. & Makino, C.L. (1996). Phototransduction in transgenic mice. *Curr Opin Neurobiol* 6, 453-458.
- Li, J.G., Luo, L.Y., Krupnick, J.G., Benovic, J.L., Liu-Chen, L.Y. (1999). U50,488H-induced internalization of the human kappa opioid receptor involves a beta-arrestin- and dynamin-dependent mechanism. Kappa receptor internalization is not required for mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 274, 12087-12094.
- Liebman, P.A. & Evanczuk, A.T. (1982). Real time assay of rod disk membrane cGMP phosphodiesterase and its controller enzymes. *Methods Enzymol* 81, 532-542.
- Linder, M.C. (1991). *Biochemistry of copper*, Plenum Publishing Corporation, New York
- Lipkin, V.M., Udovichenko, I.P., Bondarenko, V.A., Yurovskaya, A.A., Telnykh, E.V., Skiba, N.P. (1990). Site-directed mutagenesis of the inhibitory subunit of retinal rod cyclic GMP phosphodiesterase. *Biomed Sci* 1, 305-308.
- Liu, Y., Arshavsky, V.Y., Ruoho, A.E. (1996). Interaction sites of the COOH-terminal region of the gamma subunit of cGMP phosphodiesterase with the GTP-bound alpha subunit of transducin. *J Biol Chem* 271, 26900-26907.
- Lohse, M.J., Benovic, J.L., Codina, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1990). beta-Arrestin: A protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248, 1547-1550.
- Luttrell, L.M., Ferguson, S.S., Daaka, Y., Miller, W.E., Maudsley, S., Della, R.G., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D.K., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283, 655-661.
- Macreadie, I. G., Horaitis, O., Verkuylen, A.J., Savin, K.W. (1991). Improved shuttle vectors for cloning and high-level Cu<sup>2+</sup>-mediated expression of foreign genes in yeast. *Gene* 104, 107-111.
- Macreadie, I. G., Jagadish, M.N., Azad, A.A., Vaughan, P.R. (1989). Versatile cassettes designed for the copper inducible expression of proteins in yeast. *Plasmid* 21, 147-150.
- Mahlberg, K. (1989). Purification of bovine and human retinal S-antigen using immunoabsorbent polymer particles. *Ophthalmic Res* 21, 126-133.
- Manniatis, T. Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982). (In: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.)
- Mangini, N.J. & Pepperberg, D.R. (1987). Localization of retinal "48K" (S-antigen) by electron microscopy. *Jpn J Ophthalmol* 31, 207-217.
- Mangini, N.J., Garner, G.L., Okajima, T.I., Donoso, L.A., Pepperberg, D.R. (1994). Effect of hydroxylamine on the subcellular distribution of arrestin (S- antigen) in rod photoreceptors. *Vis Neurosci* 11, 561-568.
- Marston, F.A. (1986). The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem J* 240, 1-12.
- McDowell, J.H. & Kühn, H. (1977). Light-induced phosphorylation of rhodopsin in cattle photoreceptor membranes: Substrate activation and inactivation. *Biochemistry* 16, 4054-4060.

- Meilhoc, E., Masson, J.M., Teissie, J. (1990). High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses. *Biotechnology (N Y)* 8, 223-227.
- Mirshahi, M., Borgese, F., Razaghi, A., Scheuring, U., Garcia-Romeu, F., Faure, J.P., Motais, R. (1989). Immunological detection of arrestin, a phototransduction regulatory protein, in the cytosol of nucleated erythrocytes. *FEBS Lett* 258, 240-243.
- Mirshahi, M., Razaghi, A., Mirshahi, S.S., Van, T., V, Faure, J.P. (1991a). Immunopurification of an S-antigen-like protein from human platelets. *Thromb Res* 64, 551-558.
- Mirshahi, M., Nato, A., Razaghi, A., Mirshahi, A., Faure, J.P. (1991b). [Presence of arrestin (S-antigen)-like proteins in vegetable cells]. *C R Acad Sci III* 312, 441-448.
- Mirshahi, M., Razaghi, A., Vandewalle, A., Cluzeaud, F., Tarraf, M., Faure, J.P. (1992). Immunodetection and localization of protein(s) related to retinal S- antigen (arrestin) in kidney. *Biol Cell* 76, 175-184.
- Missiakas, D., Georgopoulos, C. Raina, S. (1994). The *Escherichia coli* dsbC xprA gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation. *EMBO J* 13, 2013-2020.
- Mitchell, D.A., Marshall, T.K., Deschenes, R.J. (1993). Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast. *Yeast* 9, 715-723.
- Mitraki, A., & King, J., (1989). Purification of calf prochymosin (prorennin) synthesized in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 2, 800-804.
- Moehle, C.M., Aynardi, M.W., Kolodny, M.R., Park, F.J., Jones, E.W. (1987). ProteaseB of *Saccharomyces cerevisiae*: Isolation and regulation of the PRB1 structural gene. *Genetics* 115, 255-263.
- Molday, R.S. & Molday, L.L. (1979). Identification and characterization of multiple forms of rhodopsin and minor proteins in frog and bovine rod outer segment disc membranes. Electrophoresis, lectin labeling, and proteolysis studies. *J Biol Chem* 254, 4653-4660.
- Mollaaghababa, R., Davidson, F.F., Kaiser, C., Khorana, H.G. (1996). Structure and function in rhodopsin: Expression of functional mammalian opsin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11482-11486.
- Müller, F. & Kaupp, U.B. (1998). Signaltransduktion in Sehzellen. *Naturwissenschaften* 85, 49-61.
- Murray, A.W. & Szostak, J.W. (1983). Pedigree analysis of plasmid segregation in yeast. *Cell* 34, 961-970.
- Nakamachi, Y., Nakamura, M., Fujii, S., Yamamoto, M., Okubo, K. (1998). Oguchi disease with sectoral retinitis pigmentosa harboring adenine deletion at position 1147 in the arrestin gene. *Am J Ophthalmol* 125, 249-251.
- Nakazawa, M., Wada, Y., Tamai, M. (1998). Arrestin gene mutations in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 116, 498-501.
- Newton, A.C. & Williams, D.S. (1993). Rhodopsin is the major in situ substrate of protein kinase C in rod outer segments of photoreceptors. *J Biol Chem* 268, 18181-18186.
- Nunn, B.J., Baylor, D.A. (1982). Visual transduction in retinal rods of the monkey *Macaca fascicularis*. *Nature* 299, 726-728.
- Ohguro, H., Palczewski, K., Ericsson, L.H., Walsh, K.A., Johnson, R.S. (1993a). Sequential phosphorylation of rhodopsin at multiple sites. *Biochemistry* 32, 5718-5724.

- Ohguro, H., Chiba, S., Igarashi, Y., Matsumoto, H., Akino, T., Palczewski, K. (1993b). Beta-arrestin and arrestin are recognized by autoantibodies in sera from multiple sclerosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3241-3245.
- Ohguro, H., Palczewski, K., Walsh, K.A., Johnson, R.S. (1994). Topographic study of arrestin using differential chemical modifications and hydrogen/deuterium exchange. *Protein Sci* 3, 2428-2434.
- Ohguro, H., Van Hooser, J.P., Milam, A.H., Palczewski, K. (1995). Rhodopsin phosphorylation and dephosphorylation in vivo. *J Biol Chem* 270, 14259-14262.
- Ohguro, H., Rudnicka-Nawrot, M., Buczylo, J., Zhao, X., Taylor, J.A., Walsh, K.A., Palczewski, K. (1996). Structural and enzymatic aspects of rhodopsin phosphorylation. *J Biol Chem* 271, 5215-5224.
- Onorato, J.J., Palczewski, K., Regan, J.W., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Benovic, J.L. (1991). Role of acidic amino acids in peptide substrates of the beta-adrenergic receptor kinase and rhodopsin kinase. *Biochemistry* 30, 5118-5125.
- Oshima, Y. (1982). (In: The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. Strathern, J.N., Jones, E.W., Broach, J.R., eds., Cold Spring Harbor, New York)
- Oswald, T., Wende, W., Pingoud, A., Rinas, U. (1994). Comparison of N-terminal affinity fusion domains: effect on expression level and product heterogeneity of recombinant restriction endonuclease EcoRV. *Appl Microbiol Biotechnol* 42, 73-77.
- Ovchinnikov, I., Abdulaev, N.G., Feigina, M.I., Artamonov, I.D., Bogachuk, A.S. (1983). [Visual rhodopsin. III. Complete amino acid sequence and topography in a membrane]. *Bioorg Khim* 9, 1331-1340.
- Ovchinnikov, Iu.A., Muradov, Kh.G., Feigina, M.Iu., Nazimov, I.V., Khoroshilova, N.I. (1986). Cyclic GMP-phosphodiesterase from the cattle retina. Amino acid sequence of the gamma subunit. *Dokl Akad Nauk SSSR* 287, 1496-1498.
- Ovchinnikov, Iu.A., Gubanov, V.V., Khramtsov, N.V., Akhmedov, N.B., Ishchenko, K.A. (1987). Cyclic GMP phosphodiesterase from the bovine retina. Amino acid sequence of the alpha-subunit and nucleotide sequence of corresponding cDNA. *Dokl Akad Nauk SSSR* 296, 487-491.
- Ovchinnikov, Y., Abdulaev, N.G., Bogachuk, A.S. (1988). Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitylated. *FEBS Lett* 230, 1-5.
- Palczewski, K., McDowell, J.H., Hargrave, P.A. (1988). Rhodopsin kinase: substrate specificity and factors that influence activity. *Biochemistry* 27, 2306-2313.
- Palczewski, K., Arendt, A., McDowell, J.H., Hargrave, P.A. (1989a). Substrate recognition determinants for rhodopsin kinase: studies with synthetic peptides, polyanions, and polycations. *Biochemistry* 28, 8764-8770.
- Palczewski, K., McDowell, J.H., Jakes, S., Ingebritsen, T.S., and Hargrave, P.A. (1989b). Regulation of rhodopsin dephosphorylation by arrestin. *J Biol Chem* 264, 15770-15773.
- Palczewski, K., Buczylo, J., Kaplan, M.W., Polans, A.S., Crabb, J.W. (1991a). Mechanism of rhodopsin kinase activation. *J Biol Chem* 266, 12949-12955.
- Palczewski, K., Pulvermüller, A., Buczylo, J., Hofmann, K.P. (1991b). Phosphorylated rhodopsin and heparin induce similar conformational changes in arrestin. *J Biol Chem* 266, 18649-18654.

- Palczewski, K., Buczylo, J., Imami, N.R., McDowell, J.H., Hargrave, P.A. (1991c). Role of the carboxyl-terminal region of arrestin in binding to phosphorylated rhodopsin. *J Biol Chem* 266, 15334-15339.
- Palczewski, K., Pulvermüller, A., Buczylo, J., Gutmann, C., Hofmann, K.P. (1991d). Binding of inositol phosphates to arrestin. *FEBS Lett* 295, 195-199.
- Palczewski, K., Buczylo, J., Van Hooser, P., Carr, S.A., Huddleston, M.J., Crabb, J.W. (1992a). Identification of the autophosphorylation sites in rhodopsin kinase. *J Biol Chem* 267, 18991-18998.
- Palczewski, K., Riazance-Lawrence, J.H., Johnson, W.C.J. (1992b). Structural properties of arrestin studied by chemical modification and circular dichroism. *Biochemistry* 31, 3902-3906.
- Palczewski, K., Buczylo, J., Ohguro, H., Annan, R.S., Carr, S.A., Crabb, J.W., Kaplan, M.W., Johnson, R.S., Walsh, K.A. (1994a). Characterization of a truncated form of arrestin isolated from bovine rod outer segments. *Protein Sci* 3, 314-324.
- Palczewski, K. (1994b). Structure and functions of arrestins. *Protein Sci* 3, 1355-1361.
- Parkes, J.H. & Liebman, P.A. (1984). Temperature and pH dependence of the metarhodopsin I-metarhodopsin II kinetics and equilibria in bovine rod disk membrane suspensions. *Biochemistry* 23, 5054-5061.
- Parruti, G., Peracchia, F., Sallese, M., Ambrosini, G., Masini, M., Rotilio, D., De Blasi, A. (1993). Molecular analysis of human beta-arrestin-1: cloning, tissue distribution, and regulation of expression. Identification of two isoforms generated by alternative splicing. *J Biol Chem* 268, 9753-9761.
- Pepperberg, D.R., Kahlert, M., Krause, A., Hofmann, K.P. (1988). Photolytic modulation of a highly sensitive, near-infrared light-scattering signal recorded from intact retinal photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5531-5535.
- Pepperberg, D.R., Cornwall, M.C., Kahlert, M., Hofmann, K.P., Jin, J., Jones, G.J., Ripps, H. (1992). Light-dependent delay in the falling phase of the retinal rod photoresponse. *Vis Neurosci* 8, 9-18.
- Pfister, C., Chabre, M., Plouet, J., Tuyen, V.V., de Kozak, Y., Faure, J.P., Kühn, H. (1985). Retinal S antigen identified as the 48K protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods. *Science* 228, 891-893.
- Pringle, J.R. (1975). (In: *Methods in Cell Biology*, D.B. Prescott, ed., Vol. 12, p. 149. Academic Press, New York)
- Puig, J., Arendt, A., Tomson, F.L., Abdulaeva, G., Miller, R., Hargrave, P.A., McDowell, J.H. (1995). Synthetic phosphopeptide from rhodopsin sequence induces retinal arrestin binding to photoactivated unphosphorylated rhodopsin. *FEBS Lett* 362, 185-188.
- Pulvermüller, A., Palczewski, K., Hofmann, K.P. (1993). Interaction between photoactivated rhodopsin and its kinase: stability and kinetics of complex formation. *Biochemistry* 32, 14082-14088.
- Pulvermüller, A., Maretzki, D., Rudnicka-Nawrot, M., Smith, W.C., Palczewski, K., Hofmann, K.P. (1997). Functional differences in the interaction of arrestin and its splice variant, p44, with rhodopsin. *Biochemistry* 36, 9253-9260.
- Quioco, F.A. & Richards, F.M. (1964). Intermolecular cross linking of a protein in the crystalline state: Carboxypeptidase-A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 52, 833-839.



- Razaghi, A., Bonaly, J., Chacun, H., Faure, J.P., Mirshahi, M., Barque, J.P. (1997). Immunodetection of a protein related to mammalian arrestin in *Euglena gracilis*. *Biochem Biophys Res Commun* 233, 601-605.
- Rieke, F. & Baylor, D.A. (1998). Origin of reproducibility in the responses of retinal rods to single photons. *Biophys J* 75, 1836-1857.
- Rose, A.B. & Broach, J.R. (1990). Propagation and expression of cloned genes in yeast: 2µm-circle-based vectors. *Methods Enzymol* 185, 234-279.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379.
- Schein, C.H. (1989). Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Bio/Technology* 7, 1141-1147.
- Schein, C.H. (1990). Solubility as a function of protein structure and solvent components. *Bio/Technology*, 8, 308-317.
- Schein, C.H. & Noteborn, M.H.M. (1988). Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favoured by lower growth temperature. *Bio/Technology* 6, 291-294.
- Scheuring, U., Franco, M., Fievet, B., Guizouarn, H., Mirshahi, M., Faure, J.P., Motaïs, R. (1990). Arrestin from nucleated red blood cells binds to bovine rhodopsin in a light-dependent manner. *FEBS Lett* 276, 192-196.
- Schiestl, R.H. & Gietz, R.D. (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current Genetics*, 16, 339-346.
- Schleicher, A. & Hofmann, K.P. (1987). Kinetic study on the equilibrium between membrane-bound and free photoreceptor G-protein. *J Membr Biol* 95, 271-281.
- Schleicher, A., Kühn, H., Hofmann, K.P. (1989). Kinetics, binding constant, and activation energy of the 48-kDa protein- rhodopsin complex by extra-metarhodopsin II. *Biochemistry* 28, 1770-1775.
- Schubert, C., Hirsch, J.A., Gurevich, V.V., Engelman, D.M., Sigler, P.B. (1999). Visual arrestin activity may be regulated by self-association. *J Biol Chem*, im Druck
- Sherman, F., Steward, J.W., Tsunasawa, S. (1985). Methionin or not methionin at the beginning of a protein. *Bioessays* 3, 27-31.
- Shi, W., Sports, C.D., Raman, D., Shirakawa, S., Osawa, S., Weiss, E.R. (1998). Rhodopsin arginine-135 mutants are phosphorylated by rhodopsin kinase and bind arrestin in the absence of 11-*cis*-retinal. *Biochemistry* 37, 4869-4874.
- Shinohara, T., Dietzschold, B., Craft, C.M., Wistow, G., Early, J.J., Donoso, L.A., Horwitz, J., Tao, R. (1987). Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6975-6979.
- Shinohara, T., Tsuda, M., Yamaki, K. (1989). [Structural elucidation of phototransduction proteins]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 34, 537-545.
- Silar, P., Thiele, D.J. (1991). New shuttle vectors for direct cloning in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 104, 99-102.
- Sikorski, R.S., Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.

- Sippel, K.C., DeStefano, J.D., Berson, E.L., Dryja, T.P. (1998). Evaluation of the human arrestin gene in patients with retinitis pigmentosa and stationary night blindness. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 665-670.
- Skiba, N.P., Bae, H., Hamm, H.E. (1996). Mapping of effector binding sites of transducin alpha-subunit using G alpha t/G alpha i1 chimeras. *J Biol Chem* 271, 413-424.
- Smith, D.B. & Johnson, K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathion S-transferase. *Gene* 67, 31-40.
- Smith, D.B., Davern, K.M., Board, P.G., Tiu, W.U., Garcia, E.G., Mitchell, G.F. (1986). Mr26,000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite glutathion S-transferase. *Proc. Natl Acad Sci U S A* 83, 8703-8707.
- Smith, D.P., Shieh, B.H., Zuker, C.S. (1990). Isolation and structure of an arrestin gene from *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1003-1007.
- Smith, M.B., Oakenfall, D.G. & Black, J.F. (1978). Thermal stabilization of protein by sugars and polyols. *Proc Aust Biochem Soc* 11, 4.
- Smith, W.C., Milam, A.H., Dugger, D., Arendt, A., Hargrave, P.A., Palczewski, K. (1994). A splice variant of arrestin. Molecular cloning and localization in bovine retina. *J Biol Chem* 269, 15407-15410.
- Smith, W.C., McDowell, J.H., Dugger, D.R., Miller, R., Arendt, A., Popp, M.P., Hargrave, P.A. (1999). Identification of regions of arrestin that bind to rhodopsin. *Biochemistry* 38, 2752-2761.
- Steinberg, R.H., Fisher, S.K., Anderson, D.H. (1980) Disc morphogenesis in vertebrate photoreceptors. *J Comp Neurol* 190, 501-508.
- Sterne-Marr, R., Gurevich, V.V., Goldsmith, P., Bodine, R.C., Sanders, C., Donoso, L.A., Benovic, J.L. (1993). Polypeptide variants of beta-arrestin and arrestin3. *J Biol Chem* 268, 15640-15648.
- Stryer L. (1996). Biochemie, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag
- Studier, F.W., & Moffat, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.
- Studier, F.W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* 219, 37-44.
- Stura, E.A. & Chen, P. (1992). Soaking of crystals. (In: Ducruix A. & Giegé R. Crystallization of nucleic acids and proteins, a practical approach, IRL press)
- Sunayashiki-Kusuzaki, K., Kikuchi, T., Wawrousek, E.F., Shinohara, T. (1997). Arrestin and phosducin are expressed in a small number of brain cells. *Brain Res Mol Brain Res* 52, 112-120.
- Szczypka, M. & Thiele, D.J., (1989). A cysteine-rich nuclear protein activates yeast metallothionein gene transcription. *Mol Cell Biol* 9, 421-429.
- Teng, T.-Y. (1990). Mounting of crystals for macromolecular crystallography in a free-standing thin film. *J Appl Cryst* 23, 387
- Thatcher, D.R., & Panayotatos, N. (1986). Purification of recombinant human IFN-alpha 2. *Methods Enzymol* 119, 166
- Thiele, D.J., (1992). Metal-regulated transcription in eucaryotes. *Nucleic Acids Research*, 20, 1183-1191.

- Tsernoglou, D., Hill, E., Banaszack, L.J., (1972). Cytoplasmic malate dehydrogenase-heavy atom derivatives and low resolution structure. *J Mol Biol* 69, 75
- Uchida, S., Wheeler, G.L., Yamazaki, A., Bitensky, M.W. (1981). A GTP-protein activator of phosphodiesterase which forms in response to bleached rhodopsin. *J Cyclic Nucleotide Res* 7, 95-104.
- Ulane, R.E., & Cabib, E. (1974). The activating system of chitin synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and properties of an inhibitor of the activating factor. *J Biol Chem* 249, 3418-3422.
- Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W.J., Ammerer, G. Hall, B.D. (1982). Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* 398, 347-350.
- Villarejo, M.R. & Zabin, I. (1974).  $\beta$ -galactosidase: immunological studies of nonsense, missense and deletion mutants. *J Mol Biol* 33, 35
- Vishnivetskiy, S.A., Paz, C.L., Schubert, C., Hirsch, J.A., Sigler, P.B., Gurevich, V.V. (1999). How does arrestin respond to the phosphorylated state of rhodopsin? *J Biol Chem* 274, 11451-11454.
- Voss, S. & Skerra, A. (1997). Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng* 10, 975-982.
- Vuong, T.M., Chabre, M., Stryer, L. (1984). Millisecond activation of transducin in the cyclic nucleotide cascade of vision. *Nature* 311, 659-661.
- Wacker, W.B. & Lipton, M.M. (1965). Experimental allergic uveitis: homologous retina as uveitogenic antigen. *Nature* 206, 253-254.
- Wacker, W.B. (1973). Experimental allergic uveitis. Studies on characterization and isolation of the pathogenic retina antigen. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 45, 639-656.
- Wacker, W.B., Donoso, L.A., Kalsow, C.M., Yankeelov, J.A. Jr, Organisciak, D.T. (1977). Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J Immunol* 119, 1949-1958.
- Wald, G. & Brown, P.K. (1953). The molar extinction of rhodopsin. *J Gen Physiol* 37, 189-200.
- Wald, G. & Brown, P.K. (1958). Human rhodopsin. *Science* 127, 222-226.
- Wald, G. (1968). The molecular basis of visual excitation. *Nature* 219, 800-807.
- Watanabe, M., Chen, C.Y., Levin, D.E. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 encodes a protein kinase C (PKC) homolog with a substrate specificity similar to that of mammalian PKC. *J Biol Chem* 269, 16829-16836.
- Watkins, S.J., Mesyanzhinov, V.V., Kurochkina, L.P. Hawkins, R.E. (1997). The „adenobody“ approach to viral targeting: specific and enhanced adenoviral gene delivery. *Gene Therapy* 4, 1004
- Wensel, T.G. & Stryer, L. (1986). Reciprocal control of retinal rod cyclic GMP phosphodiesterase by its gamma subunit and transducin. *Proteins* 1, 90-99.
- Wensel, T.G. & Stryer, L. (1990). Activation mechanism of retinal rod cyclic GMP phosphodiesterase probed by fluorescein-labeled inhibitory subunit. *Biochemistry* 29, 2155-2161.

- Weyand, I. (1988). Experimente zur Phosphorylierung und Mikroheterogenität von Arrestin (48-kDa Protein) aus Rinderretina. Dissertation
- Weyand, I. & Kühn, H. (1990). Subspecies of arrestin from bovine retina. Equal functional binding to photoexcited rhodopsin but various isoelectric focusing phenotypes in individuals. *Eur J Biochem* 193, 459-467.
- Wilden, U. & Kühn, H. (1982). Light-dependent phosphorylation of rhodopsin: Number of phosphorylation sites. *Biochemistry* 21, 3014-3022.
- Wilden, U., Hall, S.W., Kühn, H. (1986a). Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 1174-1178.
- Wilden, U., Wüst, E., Weyand, I., Kühn, H. (1986b). Rapid affinity purification of retinal arrestin (48 kDa protein) via its light-dependent binding to phosphorylated rhodopsin. *FEBS Lett* 207, 292-295.
- Wilden, U. (1995). Duration and amplitude of the light-induced cGMP hydrolysis in vertebrate photoreceptors are regulated by multiple phosphorylation of rhodopsin and by arrestin binding. *Biochemistry* 34, 1446-1454.
- Wilden, U., Choe, H.W., Krafft, B., Granzin, J. (1997). Crystallization and preliminary X-ray analysis of arrestin from bovine rod outer segment. *FEBS Lett* 415, 268-270.
- Wilsbach, K. & Payne, G.S. (1993). Vps1p, a member of the dynamin GTPase family, is necessary for golgi membrane protein retention in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 12, 3049-3059.
- Wingfield, P.T., (1995). Overview of the purification of recombinant proteins produced in *Escherichia coli*. *Current Protocols in Protein Science*, Chapter 6.1
- Yamaki, K., Takahashi, Y., Sakuragi, S., Matsubara, K. (1987). Molecular cloning of the S-antigen cDNA from bovine retina. *Biochem Biophys Res Commun* 142, 904-910.
- Yoshizawa, T. & Shichida, Y. (1982). Low-temperature spectrophotometry of intermediates of rhodopsin. *Methods Enzymol* 81, 333-354.
- Xu, J., Dodd, R.L., Makino, C.L., Simon, M.I., Baylor, D.A., Chen, J. (1997). Prolonged photoresponses in transgenic mouse rods lacking arrestin. *Nature* 389, 505-509.
- Zapun, A., Missiakas, D., Raina, S. Creighton T.E. (1995). Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 34, 5075-5089.
- Zhang, J., Ferguson, S.S., Law, P.Y., Barak, L.S., Caron, M.G. (1999). Agonist-specific regulation of delta-opioid receptor trafficking by G protein-coupled receptor kinase and beta-arrestin. *J Recept Signal Transduct Res* 19, 301-313.
- Zigler, J.S.J., Mochizuki, M., Kuwabara, T., Gery, I. (1984). Purification of retinal S-antigen to homogeneity by the criterion of gel electrophoresis silver staining. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25, 977-980.
- Zuckerman, R. & Cheasty, J.E. (1986). A 48 kDa protein arrests cGMP phosphodiesterase activation in retinal rod disk membranes. *FEBS Lett* 207, 35-41.
- Zuker, C.S. & Ranganathan, R. (1999). The path to specificity. *Science* 283, 650-651.

## 7. Anhang

### 7.1. Kodierende DNA- und Aminosäuresequenz von Arrestin aus dem Rinderauge

Die Aminosäuren Ser 60, Cys 63, Cys 128, Cys 143, Ser 169, Val 244 und Pro 352 sind im Zeichenformat "fett" hervorgehoben.

```

1/1                                31/11
atg aag gcc aat aag ccc gca cca aac cac gtt atc ttc aag aag atc tcc cgt gat aaa
Met lys ala asn lys pro ala pro asn his val ile phe lys lys ile ser arg asp lys
61/21                                91/31
tcg gtg acc atc tac ctg ggg aag aga gat tac ata gac cac gtt gaa cga gta gag cct
ser val thr ile tyr leu gly lys arg asp tyr ile asp his val glu arg val glu pro
121/41                                151/51
gtg gat ggc gtc gtg ctg gtg gat cct gag ctc gtg aag ggc aag aga gtg tac gtg tot
val asp gly val val leu val asp pro glu leu val lys gly lys arg val tyr val ser
181/61                                211/71
ctg acg tgt gcc ttc cgc tac ggc cag gaa gac atc gac gtg atg ggc ctc agc ttc cgc
leu thr cys ala phe arg tyr gly gln glu asp ile asp val met gly leu ser phe arg
241/81                                271/91
agg gac ctc tac ttc tcc cag gtc cag gtg ttc cct ccc gtg ggg gcc tcg ggc gcc acc
arg asp leu tyr phe ser gln val gln val phe pro pro val gly ala ser gly ala thr
301/101                                331/111
acg agg ctg cag gag agc ctc atc aag aag ctg ggg gcc aac acc tac ccc ttc ctg ctc
thr arg leu gln glu ser leu ile lys lys leu gly ala asn thr tyr pro phe leu leu
361/121                                391/131
acg ttt cct gac tac ttg ccc tgt tcg gtg atg ctg cag cca gct ccg caa gat gtg ggc
thr phe pro asp tyr leu pro cys ser val met leu gln pro ala pro gln asp val gly
421/141                                451/151
aag agc tgt ggg gtc gac ttt gag atc aaa gca ttc gcc acg cac agc aca gat gtg gaa
lys ser cys gly val asp phe glu ile lys ala phe ala thr his ser thr asp val glu
481/161                                511/171
gag gac aaa att ccc aag aag agc tcc gtg cgt ttg ctg atc cgg aag gta cag cac gcg
glu asp lys ile pro lys lys ser ser val arg leu leu ile arg lys val gln his ala
541/181                                571/191
cca cgc gat atg ggt ccc cag ccc cga gcc gag gcc tcc tgg cag ttc ttc atg tcg gac
pro arg asp met gly pro gln pro arg ala glu ala ser trp gln phe phe met ser asp
601/201                                631/211
aag ccc ctg cgc ctc gcc gtc tcg ctc agc aaa gag atc tat tac cac ggg gaa ccc att
lys pro leu arg leu ala val ser leu ser lys glu ile tyr tyr his gly glu pro ile
661/221                                691/231
cct gtg acc gtg gcc gtg acc aac agc aca gag aag aca gtg aag aag att aaa gtg cta
pro val thr val ala val thr asn ser thr glu lys thr val lys lys ile lys val leu
721/241                                751/251
gtg gag caa gtg acc aac gtg gtt ctc tac tcg agt gat tat tac atc aag acg gtg gct
val glu gln val thr asn val val leu tyr ser ser asp tyr tyr ile lys thr val ala
781/261                                811/271
gcc gag gaa gca cag gaa aaa gtg ccg cca aac agc tcg ctg acc aag acg ctg acg ctg
ala glu glu ala gln glu lys val pro pro asn ser ser leu thr lys thr leu thr leu
841/281                                871/291
gtg ccc ttg ctg gcc aac aac cgt gag aga agg ggc atc gcc ctg gat ggg aaa atc aag
val pro leu leu ala asn asn arg glu arg arg gly ile ala leu asp gly lys ile lys

```

901/301

cac gag gac acg aac ctg gcc tcc agc acc atc ata aag gag gga ata gac aag acc gtc  
his glu asp thr asn leu ala ser ser thr ile ile lys glu gly ile asp lys thr val

961/321

atg ggg atc ctg gtg tct tac cag atc aag gtg aag ctc acg gtg tca ggc ctt ctg gga  
met gly ile leu val ser tyr gln ile lys val lys leu thr val ser gly leu leu gly

1021/341

gag ctc aca tcc agt gaa gtg gcc act gag gtg **ccg** ttc cgc ctc atg cat ccc cag cca  
glu leu thr ser ser glu val ala thr glu val **pro** phe arg leu met his pro gln pro

1081/361

gag gac cca gat acc gcc aag gaa agt ttt cag gat gaa aat ttt gtt ttt gag gag ttt  
glu asp pro asp thr ala lys glu ser phe gln asp glu asn phe val phe glu glu phe

1141/381

gct cgc caa aat ctg aaa gat gca gga gaa tat aag gaa gag aag aca gac cag gag gcg  
ala arg gln asn leu lys asp ala gly glu tyr lys glu glu lys thr asp gln glu ala

1201/401

gct atg gat gag tga

ala met asp glu OPA

931/311

991/331

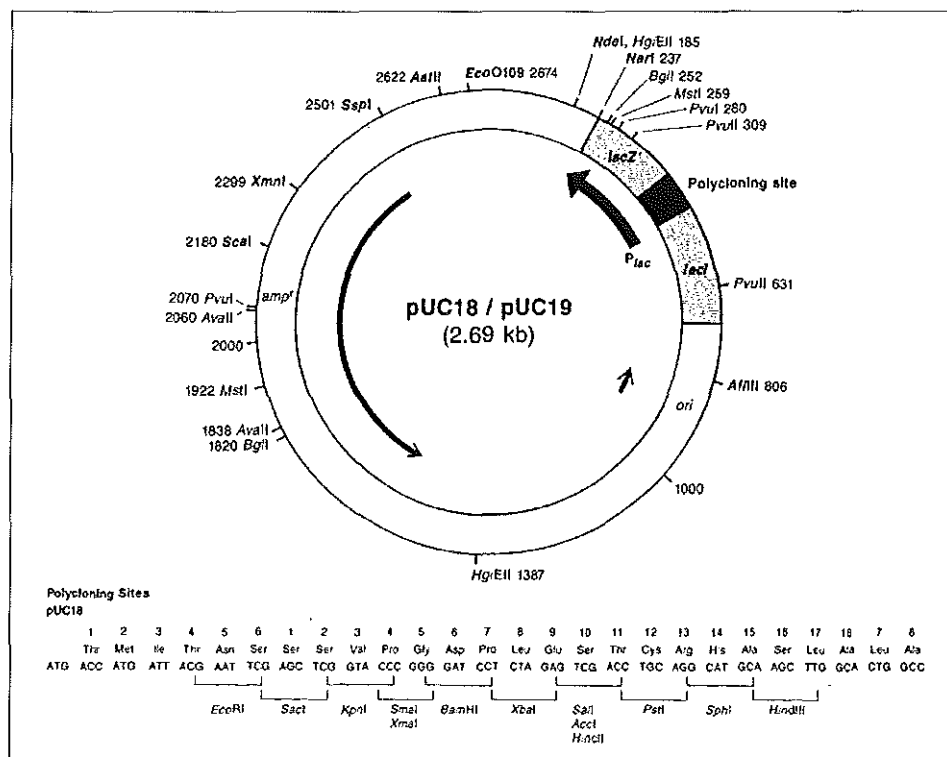
1051/351

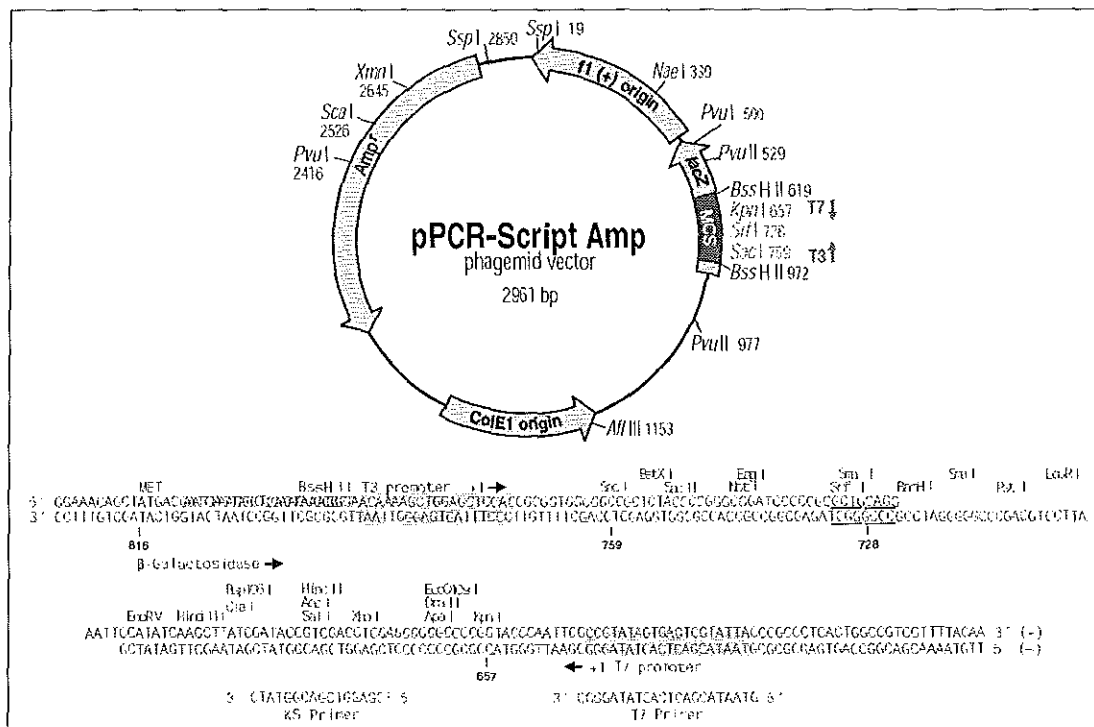
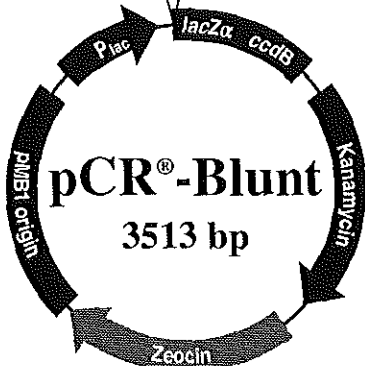
1111/371

1171/391

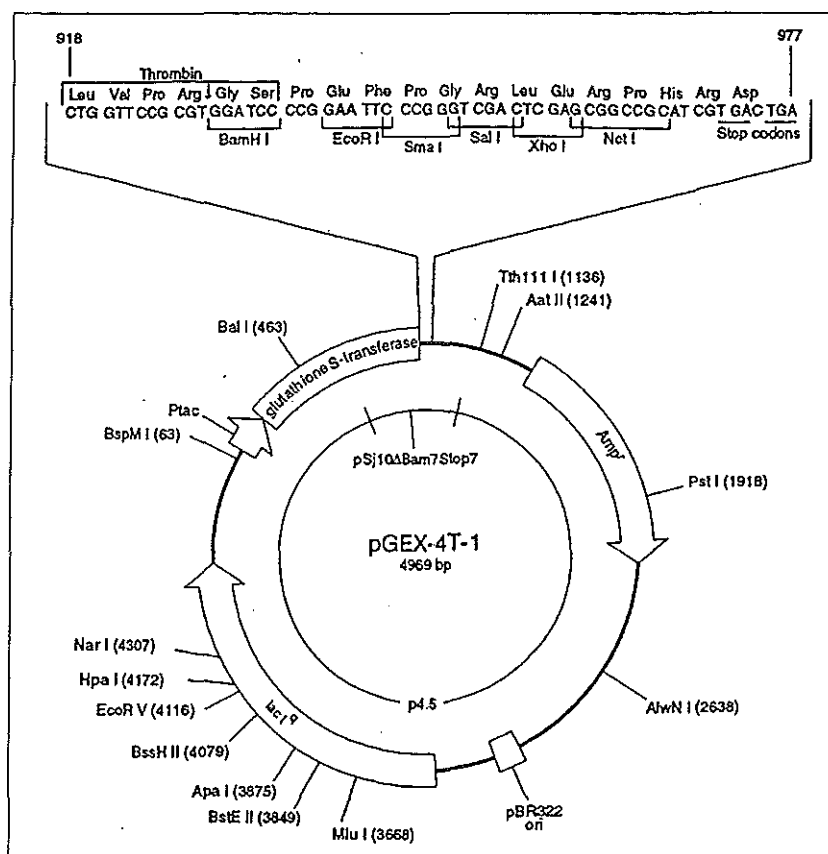
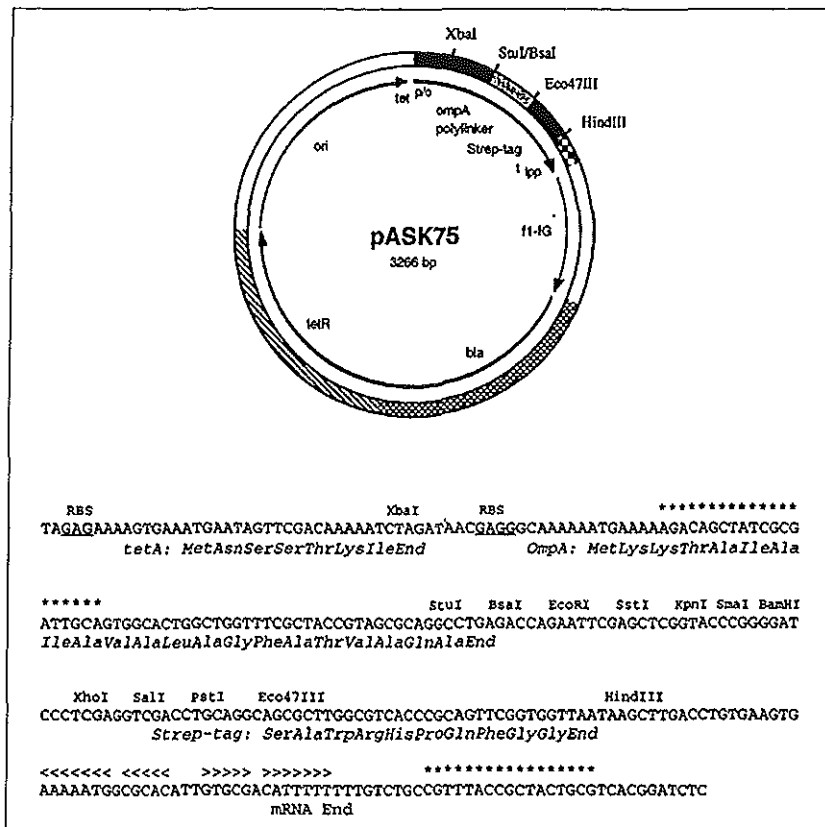
## 7.2. Plasmide und Vektoren

### 7.2.1. Klonierungsvektoren

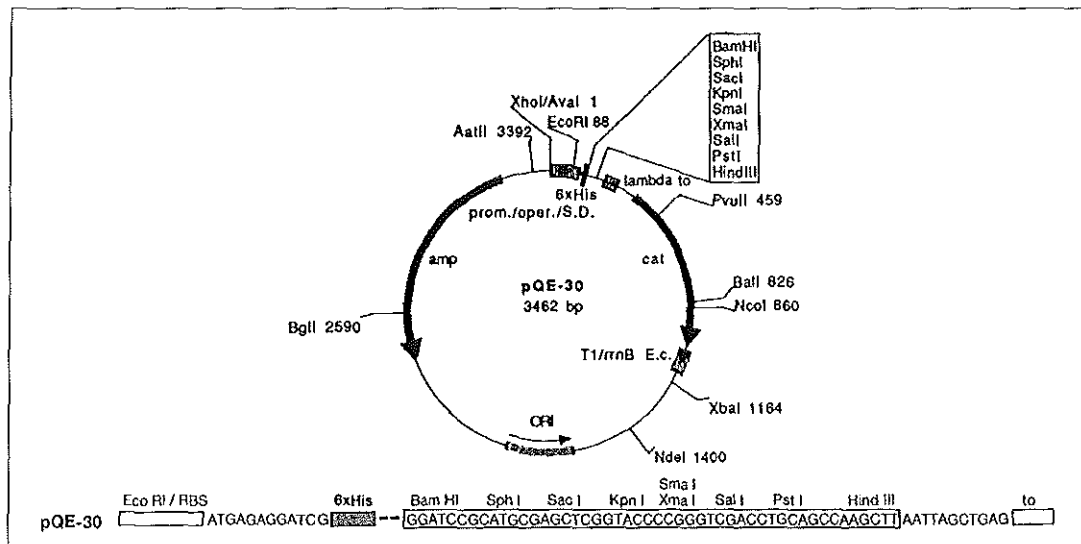




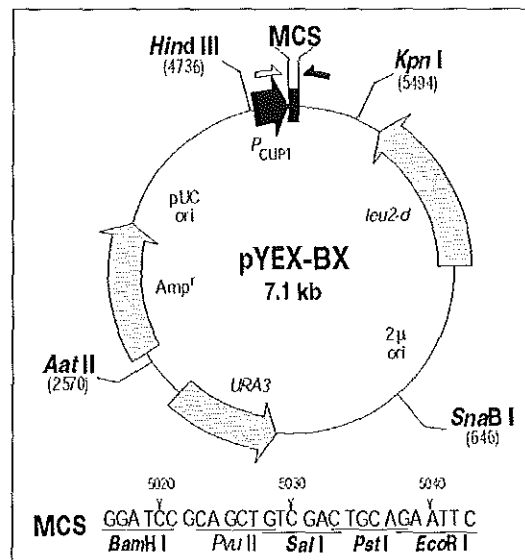
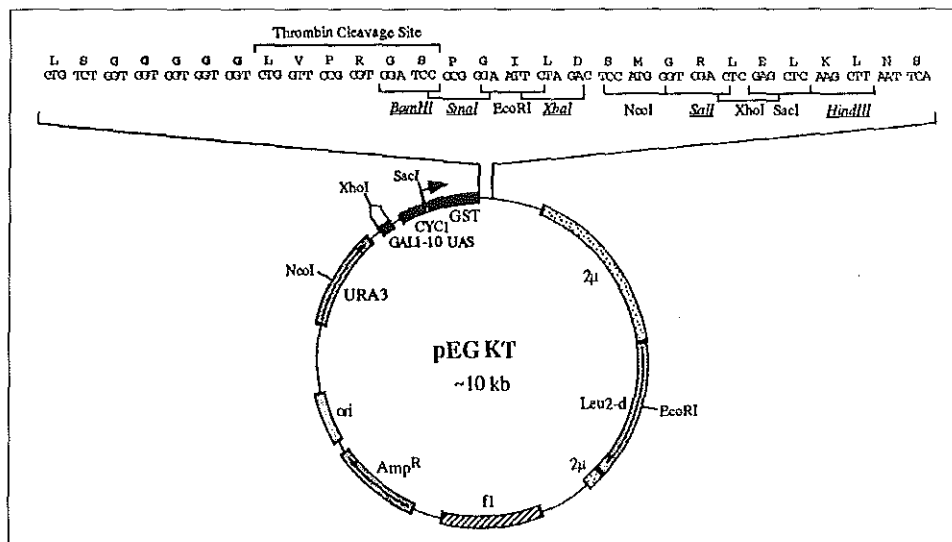
## 7.2.2. *E. coli* Expressionsvektoren



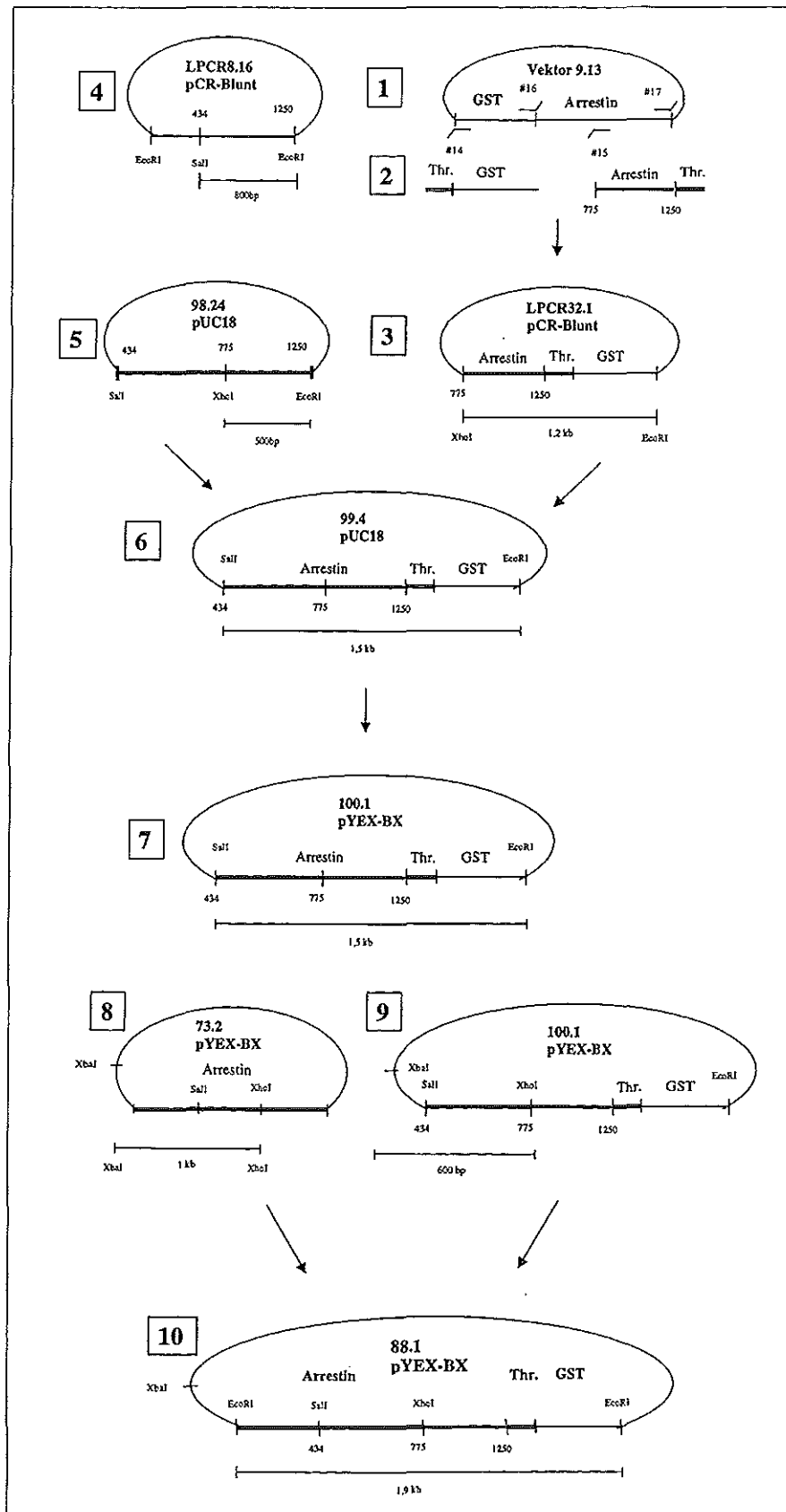




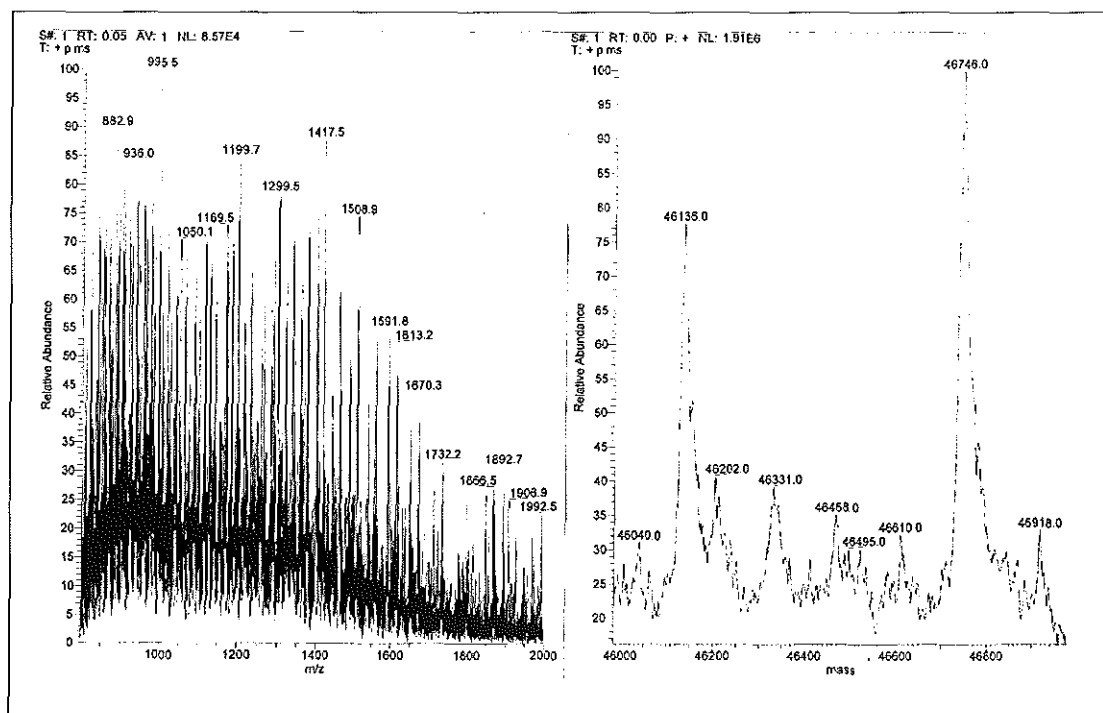
### 7.2.3. *E. coli* – *S. cerevisiae* Shuttle Vektoren



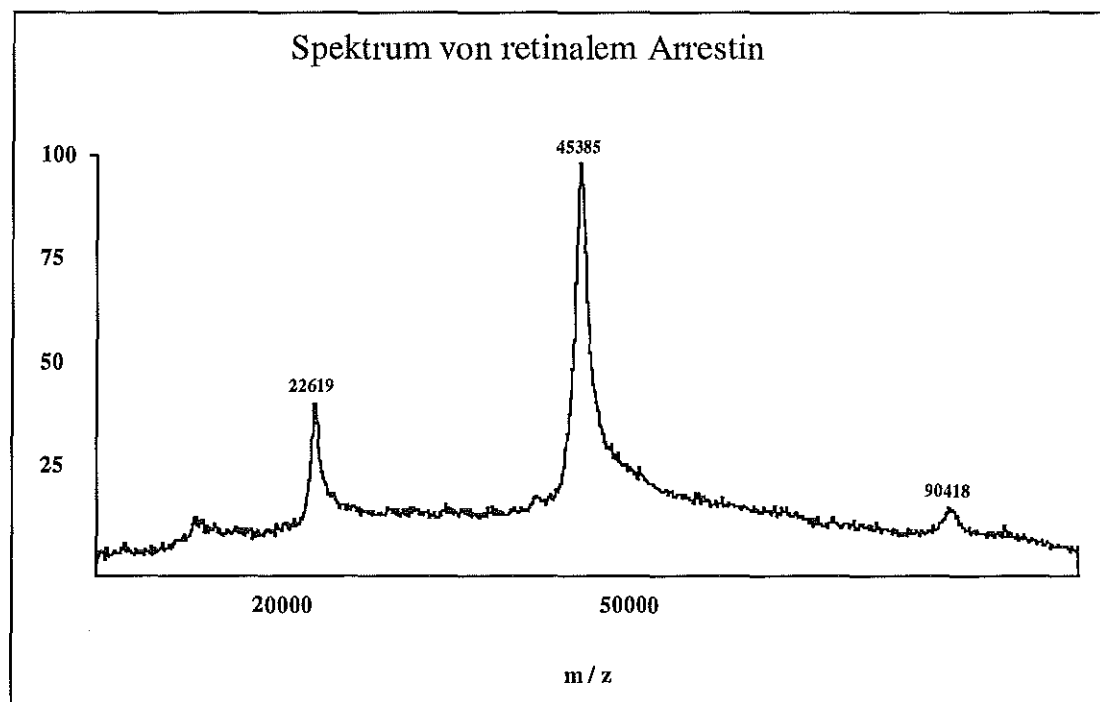
### 7.3. Klonierungsschema für Arrestin-GST im Vektor pYEX-BX

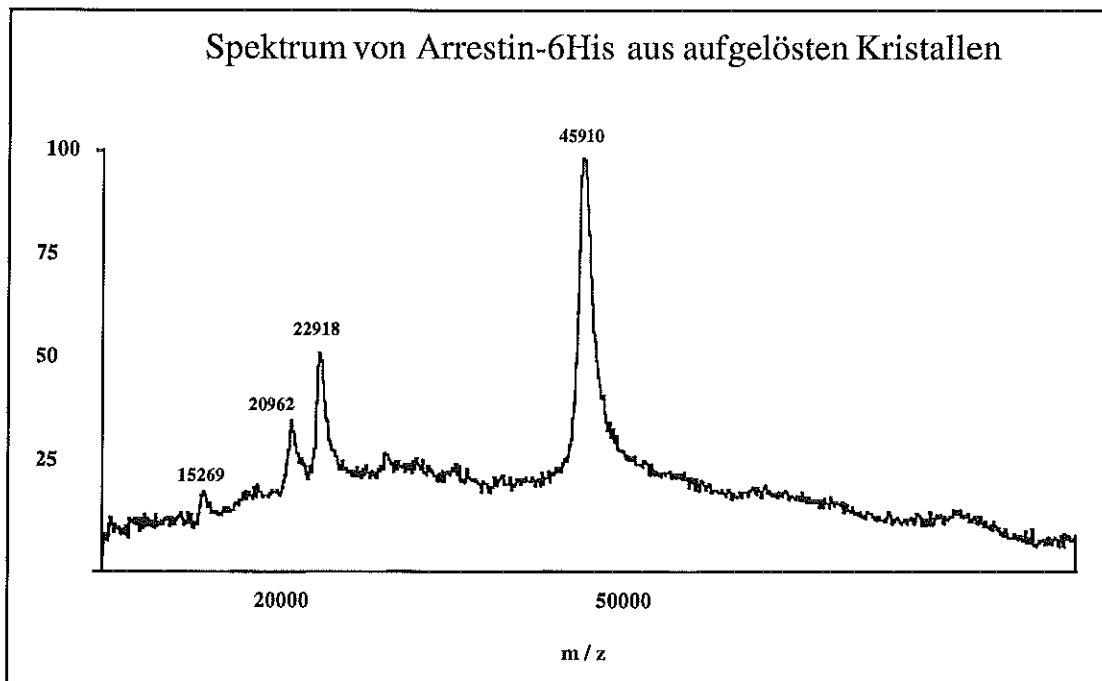
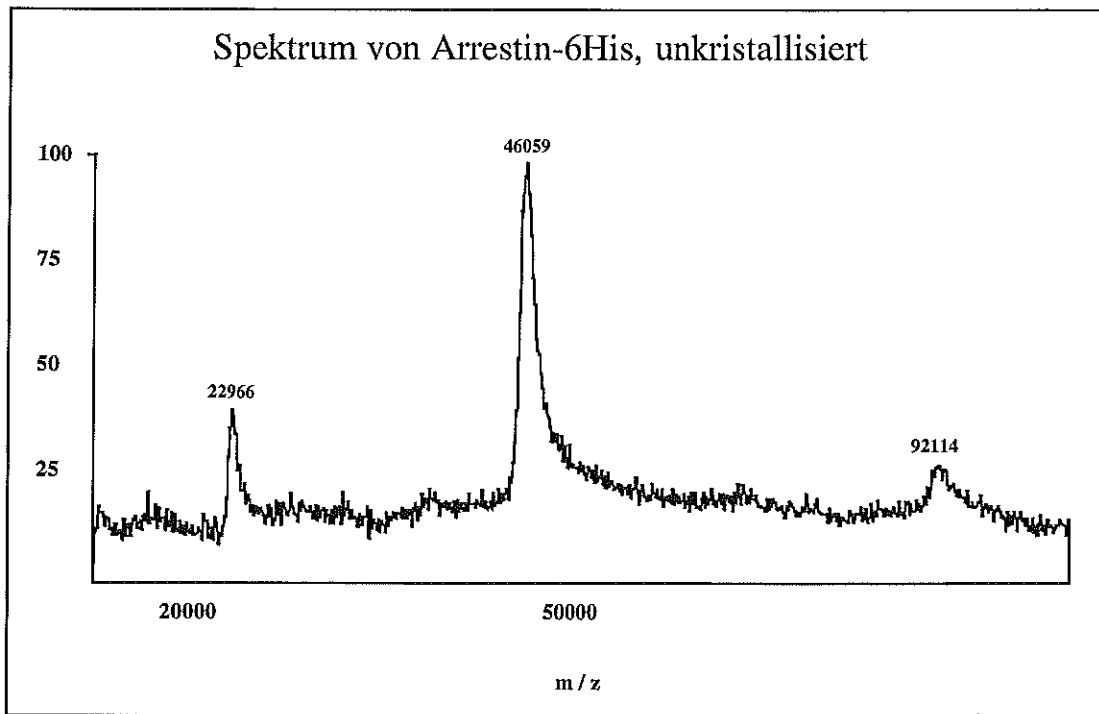


## 7.4. ESI-Spektrum von Arrestin-StrepTagII



## 7.5. MALDI-Spektren





## 7.6. Abkürzungen

::	Insertion
Δ	Deletion
3D	dreidimensional
48K	Arrestin
A	Adenosin, Ampere
Å	Angström
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AHT	Anhydrotetrazyklin
amu	atomic mass units
BFM	Biofeuchtmasse
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-	Carboxy-
°C	Grad Celsius
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
-d	defekt
D	Dextrose (englisch für Glukose)
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTPs	Desoxy-Nukleosid Triphosphat
EDTA	N, N-Ethylendiaminotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(b-Aminoethylether) N', N', N', N' Tetraessigsäure
EG	Ethylenglykol
EMS	Ethylmethansulfonat
ESI	Elektro Spray Ionisierung
Faktor Xa	Protease Xa
FPLC	Fast Pressure Liquid Chromatography
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Galaktose, Guanosin
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GuCl	Guanidiniumhydrochlorid
h	Stunde
HABA	4-Hydroxybenzen-2-carboxysäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IMAC	Immobilised Metal Affinity Chromatography

IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-Thiogalaktosid
IR	Infrarot
K	Kelvin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
LiAc	Lithiumacetat
M	Molar
MALDI	Matrix Assisted Lased Desorption Ionisation
MCS	Multiple Cloning Site
min	Minute
MRGS	Methionin-Arginin-Glycin-Serin
N-	Amino-
NADPH	Nikotinadenindinukleotidphosphat
NADH	Nikotinadenindinukleotid
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei x Nanometern
P	Pellet, unlösliche Fraktion
p44	Protein, Spleißvariante von Arrestin
pH	negativer dekadische Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pI	pH-Wert an dem ein Protein keine Ladungen trägt
P-R	phosphoryliertes Rhodopsin im Grundzustand
P-R*	phosphoryliertes, lichtaktiviertes Rhodopsin in Meta II
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PEG	Polyethylenglykol
PES	Polyethersulfon
PIP	Di- $\mu$ -Iodobis(ethylendiamin)-diplatin(II)nitrat
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
PMBs	<i>in vitro</i> phosphorylierte ROS-Membranen
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
ppm	parts per million
PrB	Protease B
PRINTS	Protein Fingerprint Database
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Rhodopsin im Grundzustand
R*	Rhodopsin in Meta II (lichtaktiviert)
ROS	Rod Outer Segments (Stäbchenaußensegmente)
RT	Raumtemperatur
S-Antigen	Arrestin
SA-AP	Streptavidin-Alkalische Phosphatase
SC	Synthetic Complete
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
ss	Signalsequenz
SWISS-PROT	Protein Sequenz Datenbank am Institut für Bioinformatik, Genf
T	Thymin, Transducin
Tab.	Tabelle
TBS	Tris gepufferte Saline

TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N', Tetramethylethyldiamin
TM	eingetragenes Warenzeichen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween 20	Polyoxybenzethylensorbitanmonolaureat
U	Unit ( $\mu\text{mol Substrat min}^{-1} \text{ mg Protein}$ )
u.a.	unter anderem
UAS	Upstream Activating Sequence
Ü	Überstand, lösliche Fraktion
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VIS	Visible (sehbares Licht)
v/v	Volumenanteil
W-ROS	gewaschene ROS-Membranen
wt	wildtypisch
w/v	Masse pro Volumen
x	mal
YGSC	Yeast Genetics Stock Center
YNB	Yeast Nitrogen Base (Hefe Stickstoffbase)
YP	Yeast Pepton

Die Aminosäuresequenzen wurden im Ein- und Dreibuchstabencode nach den Regeln der „IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature“ angegeben (Eur. J. Biochem. 5 [1968], 151-153).





## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen meinen Dank aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Allen Mitgliedern des IBI-2 sei für das angenehme Arbeitsklima sowie die ständige Diskussionsbereitschaft und Hilfestellung bei den verschiedensten Problemen gedankt.

Mein ganz besonderer Dank gilt:

- Vor allem meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich stets uneingeschränkt unterstützt haben.
- Prof. Dr. Georg Büldt für die Überlassung des Themas und sein Interesse daran, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die, über meine Arbeit hinausgehende, Unterstützung und Betreuung.
- Dr. Ramona Schlesinger herzlich für die freundschaftliche Betreuung, ihr ständiges Interesse und ihre Diskussionsbereitschaft, die wertvollen Ideen und Ratschläge zum Fortgang der Arbeit, die Hilfe bei der Auswahl der Mutagenesestellen, das akribische Korrekturlesen dieser Arbeit sowie Unterstützung in allen Lebenslagen.
- Dr. Ursula Wilden insbesondere dafür, daß sie ihr umfangreiches Wissen über Arrestin, Rhodopsin und die Sehkaskade mit mir geteilt hat. Danke für die ständige Diskussionsbereitschaft, die vielen Tips und Tricks zur Kristallisation von Arrestin und zur Durchführung von Aktivitätstests, sowie dem Korrekturlesen dieser Arbeit.
- Dr. Joachim Granzin im Besonderen für die Durchführung der kristallographischen Arbeiten, seine Hilfe bei vielen Abbildungen und der Literaturliste, das Korrekturlesen dieser Arbeit sowie der geduldigen Erklärung von kristallographischen Alltäglichkeiten.
- Meiner Schwester Doris Krafft für die prima, ganz tolle Hilfe bei den vielen Abbildungen dieser Arbeit und die Einführung in die Geheimnisse des Photoshops.
- Dr. Elisabeth Fuss für viele gute Tips in Sachen Proteinhandling, so manches leckere Essen, die nächtliche Gesellschaft im Labor und das Korrekturlesen der Arbeit.
- Ulf Eidhoff für die Isolation von p44 mit seinem Phosphatpuffer, das Korrekturlesen der Arbeit sowie Bier und Lumumba nach Feierabend. Haben fertig!
- Anne Cousin für die Durchführung aller Augenpräparationen, der Herstellung von Retinaextrakten und ROS-Präparationen, sowie Isolation von retinalem Arrestin.
- Ilona Ritter für die Hilfe bei Expression und Reinigung von Arrestin in Hefe.
- Dirk Neff, und Dirk Fastermann für das Korrekturlesen dieser Arbeit.
- Dr. Martin Engelhard vom Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund für die Ermöglichung der ESI-MS und Edmann-Abbau Untersuchungen meiner Proteinproben. Ansgar Wegener danke ich für die Organisation der Messungen und seine Hilfsbereitschaft.
- Prof. Dr. Maria Kula vom Institut für Enzymtechnologie der Universität Düsseldorf für die Ermöglichung der MALDI-Untersuchungen meiner Proteinproben. Dipl. Ing. Anja Rodenbrock danke ich für die Durchführung und Auswertung der MALDI-Untersuchungen, die Aufbereitung der Spektren sowie ihre Hilfsbereitschaft.
- Dr. Frank Becker für die Überlassung des Vektors pYEX-BX und des Stammes F11.
- Dr. Steven Saville für die Überlassung der YPH-Stämme und des Vektors pEG-KT.
- Dr. Larry Donoso und Dr. Ingo Weyand für die Überlassung der anti-Arrestin Antikörper.



## VERÖFFENTLICHUNGEN

1. Granzin, J., Wilden, U., Choe, H.W., Labahn, J., Krafft, B., Büldt, G. (1998). X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments. *Nature* *391*, 918-921.
2. Wilden, U., Choe, H.W., Krafft, B., Granzin, J. (1997). Crystallization and preliminary X-ray analysis of arrestin from bovine rod outer segment. *FEBS Lett* *415*, 268-270.





Forschungszentrum Jülich



Jül-3675

Juli 1999

ISSN 0944-2952